

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München – Innenstadt  
Direktor Professor Dr. med. Klaus Frieze

**Die prognostische Bedeutung von HER-2/neu – Amplifikation  
und Überexpression, sowie disseminierter Tumorzellen im Knochenmark  
bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Boriana Jahns

aus Pazardzhik, Bulgarien

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Sommer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Janni

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. D. Rjosk-Dendorfer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2009

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1. Entwicklung des Ovars	9
1.2. Aufbau und Funktionen des Ovars	9
1.3. Ovarialkarzinome	10
1.3.1. Epidemiologie	10
1.3.2. Onkogenese	11
1.3.2.1. Familiäres Ovarialkarzinomrisiko	11
1.3.2.2. Tumorentstehung, Molekularbiologie	12
1.3.2.2a. Onkogene	13
1.3.2.2b. Tumorsuppressor – Gene	13
1.3.2.2c. Wachstumsfaktoren und Zytokinstimulation	14
1.4. HER-2/neu (= engl. Human Epidermal Growth Faktor receptor-2)	15
1.4.1. Aufbau und Funktion von HER-2/neu	15
1.4.2. Die Rolle von HER-2/neu in Ovarialkarziomen	18
1.5. Einteilung der Ovarialtumoren	19
1.5.1. Epitheliale Ovarialtumoren	19
1.5.2. Keimstrang–Stroma–Tumoren des Ovars	20
1.5.3. Keimzelltumoren des Ovars	20
1.5.4. Metastasen	21
1.6. Stadieneinteilung maligner Ovarialtumoren	21
1.7. Prognose der Ovarialtumoren	23
1.7.1. Die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als prognostischer Faktor für Patientinnen mit Ovarialkarzinom	24
1.7.2. HER-2/neu als prognostischer Faktor für Patientinnen mit Ovarialkarzinom	26
1.8. Symptome und Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms	27
1.9. Therapie der Ovarialkarzinome	28
1.9.1. Operative Therapie	28
1.9.2. Chemotherapie	30
1.9.3. Strahlentherapie	32
1.9.3.1. Adjuvante Strahlentherapie	32
1.9.3.2. Palliative perkutane Strahlentherapie	32

---

1.9.4. Hormontherapie.....	32
1.9.5. Immuntherapie.....	33
1.9.5.1. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der Stufe der Ligandenbindung.....	33
2.9.5.2. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der intrazellulären Stufe.....	35
2.9.5.3. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der Transkriptions- und Genstufe.....	36
<b>2. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>39</b>
3.1. Patienten.....	39
3.2. Material.....	39
3.2.1. Chemikalien.....	39
3.2.2. Kits.....	40
3.2.3. Geräte.....	41
3.2.4. Mikroskopieausrüstung und Zubehör.....	41
3.2.5. Zusätzliche Laborutensilien.....	41
3.3. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	42
3.3.1. Probeverarbeitung und Herstellung der Präparate.....	42
3.3.1.1. Probeentnahme und Verarbeitung.....	42
3.3.1.2. Vorbereitung der Präparate.....	42
3.3.1.2a. Prinzip.....	42
3.3.1.2b. Materialien und Vorbereitung der Lösungen.....	43
3.3.1.2c. Durchführung.....	44
3.3.2. Assay – Verfahren.....	45
3.3.2.1. Hybridisierung.....	45
3.3.2.1a. Prinzip.....	45
3.3.2.1b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	45
3.3.2.1c. Durchführung (möglichst im Dunkeln).....	46
3.3.2.2. Waschvorgang nach Hybridisierung.....	46
3.3.2.2a. Prinzip.....	46
3.3.2.2b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	47

---

3.3.2.2c Durchführung (möglichst im Dunkeln).....	47
3.3.2.3. Aufbewahrung der Präparate.....	48
3.3.2.4. Auszählung der Sondensignale.....	48
3.3.2.4a. Sicherstellen, dass das mikroskopische Präparat von ausreichender Qualität ist.....	48
3.3.2.4b. Auszählung der Fluoreszenzsignale.....	49
3.3.2.5. Interpretation der Ergebnisse.....	51
3.4. Immunhistochemie.....	51
3.4.1. Schneiden der in Paraffin eingebetteten Präparate und Fixieren der Schnitte auf Objektträger.....	52
3.4.2. Vorbereitung der Präparate.....	52
3.4.2.1. Trocknen und Entparaffinieren.....	52
3.4.2.1a. Prinzip.....	52
3.4.2.1b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	52
3.4.2.1c. Durchführung.....	52
3.4.2.2. Hitzeinduzierte Demaskierung.....	53
3.4.2.2a. Prinzip.....	53
3.4.2.2b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	53
3.4.2.2c. Durchführung.....	53
3.4.2.3. Blockierung der endogenen Peroxidase.....	54
3.4.2.3a. Prinzip.....	54
3.4.2.3b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	54
3.4.2.3c. Durchführung.....	54
3.4.2.4. Blockieren mit Normalserum.....	55
3.4.2.4a. Prinzip.....	55
3.4.2.4b. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	55
3.4.2.4c. Durchführung.....	55
3.4.3. Ansetzen der Primärantikörper.....	55
3.4.3.1. Prinzip.....	55
3.4.3.2. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	56
3.4.3.3. Durchführung.....	56
3.4.4. Ansetzen der Sekundärantikörper.....	56
3.4.4.1. Prinzip.....	56
3.4.4.2. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	56

---

3.4.4.3. Durchführung.....	57
3.4.5. Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex).....	57
3.4.5.1. Prinzip.....	57
3.4.5.2. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	57
3.4.5.3. Durchführung.....	57
3.4.6. Substratfärbung mit dem Chromogen DAB (3,3 Diaminobenzidin) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer.....	58
3.4.6.1. Prinzip.....	58
3.4.6.2. Material und Vorbereitung der Lösungen.....	58
3.4.6.3. Durchführung (möglichst im Dunkeln).....	58
3.4.7. Interpretation der Ergebnisse.....	59
3.5. Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Knochenmark.....	60
3.5.1. Durchführung der Knochenmarkaspirationen.....	60
3.5.2. Aufbereitung des Knochenmarkaspirates und Detektion Zytokeratin- positiver Zellen.....	60
3.5.2.1. Das Anfertigen knochenmarkszelltragender Zytospins.....	61
3.5.2.2. Die immunzytochemische Färbung des Zytospins.....	62
3.5.2.2a. Material.....	62
3.5.2.2b. Durchführung.....	63
3.5.3. Interpretation der Ergebnisse.....	63
3.5.4. Positiv und Negativ Kontrolle/ Spezifitätskontrolle.....	64
3.6. Nachsorge.....	64
3.7. Statistik .....	65
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
4.1. Patienten- und Tumorcharakteristika.....	66
4.2. Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms.....	67
4.3. HER-2/neu Überexpressions- und Amplifikationsrate.....	69
4.3.1. Immunhistochemie.....	69
4.3.2. Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung.....	72
4.4. Korrelation der HER-2/neu Proteinüberexpression und Genamplifikation mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.....	74
4.4.1. Korrelation zwischen der HER-2/neu Proteinüberexpression und der HER- 2/neu Genamplifikation.....	74

---

4.4.2. Korrelation zwischen dem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Proteinüberexpression.....	75
4.4.3. Korrelation zwischen dem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Genamplifikation.....	75
4.5. Nachbeobachtung.....	76
4.5.1. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen .....	76
4.5.1.1. Univariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen.....	76
4.5.1.1a. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	76
4.5.1.1b. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Überexpression.....	78
4.5.1.1c. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation.....	79
4.5.1.1d. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren.....	80
4.5.1.2. Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen..	83
4.5.2. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen .....	84
4.5.2.1. Univariate Analyse für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen.....	84
4.5.2.1a. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	85
4.5.2.1b. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Überexpression..	86
4.5.2.1c. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation.....	88
4.5.2.1d. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren.....	89
4.5.2.2. Multivariate Analyse für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen.....	91
4.5.3. Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen .....	92
4.5.3.1. Univariate Analyse .....	92

4.5.3.1a. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	92
4.5.3.1b. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Überexpression.....	94
4.5.3.1c. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation.....	95
4.5.3.1d. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren.....	96
4.5.3.2. Multivariate Analyse .....	99
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
5.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms.....	100
5.2. HER-2/neu.....	103
5.2.1. HER-2/neu Proteinüberexpression.....	103
5.2.2. HER-2/neu Genamplifikation.....	109
5.3. Korrelation der Ergebnisse der HER-2/neu Bestimmung mittels IHC und FISH..	112
5.4. Die klassischen prognostischen Faktoren für das Ovarialkarzinom.....	115
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>146</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>148</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>149</b>





Der Eierstock enthält die weiblichen Keimzellen, die sich zu befruchtungsfähigen Eizellen entwickeln. Andererseits ist er eine endokrine Drüse, die vorwiegend Sexualhormone (Östrogene und Progesteron) produziert. Dadurch reguliert das Ovar das zyklische Geschehen im Genitaltrakt der Frau und beeinflusst ihre physische und psychische Entwicklung.

Seine Form, Größe und äußere Gestalt zeigen Unterschiede abhängig vom Alter und Funktionszustand. Bei der geschlechtsreifen Frau sind sie vorwiegend grau-weiße, etwa 4 x 2 x 1 cm große Organe. Ihre am Anfang der Pubertät glatte Oberfläche zeigt mit der Zeit narbige Einziehungen, als Folge vieler Ovulationen. In bestimmten Funktionsstadien wölben sich die Follikel verschiedener Größe an der Oberfläche vor.

Die Ovarien liegen im kleinen Becken der Frau, umgeben von je einer Bauchfellduplikatur. Ihre Lage kann passiv oder aktiv durch zwei muskulo – elastische Bänder (das Ligamentum suspensorium ovarii und das Ligamentum ovarii proprium) verändert werden, was eine wichtige Rolle im Eiauffangmechanismus spielt.

Wenn man den Innenaufbau des Ovars betrachtet, unterscheidet man eine äußere Rindenzone (Cortex ovarii) und eine innere Markzone (Medulla ovarii). In der Rindenzone des Ovars befinden sich die Follikel, die verschiedene Reifungsstufen durchlaufen: Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel. In den Ovarialfollikeln werden Hormone (Östrogen, Androgene, Steroidhormone) gebildet.

Da das Ovar in der Bauchhöhle fast frei liegt und seine Größe nur wenige Zentimeter beträgt, zeigen Ovarialkarzinome meist erst im späten Stadium Symptome (wie z.B. Bauchumfangszunahme oder Druckgefühl im Unterbauch).

## **1.3. Ovarialkarzinome**

### **1.3.1. Epidemiologie**

Die Ovarialkarzinome stellen die fünfthäufigste maligne Erkrankung der Frau dar. Sie stehen an vierter Stelle der Todesursachen bei den Krebserkrankungen und haben die führende Position als Todesursache unter den malignen gynäkologischen Erkrankungen in Europa [3, 4]. Die Inzidenz liegt bei 20/100 000 Frauen/Jahr (Trend gleich bleibend), die Mortalität bei 5/100 000 Frauen/Jahr und das mittlere

Erkrankungsrisiko bei 66,3 Jahren. Fast 10% treten bei Frauen unter 45 Jahren auf [5].

### **1.3.2. Onkogenese**

Die Entstehung des Ovarialkarzinoms wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, die einzeln oder häufiger kombiniert auftreten können. Bekannte Risikofaktoren sind: zunehmendes Alter, Umwelt- und Ernährungseinflüsse, Rauchen, Chemikalien. Vermehrtes Auftreten von Ovarialkarzinomen wird bei Infertilität und Nulliparität beobachtet. Auf der anderen Seite scheinen die Zahl der Schwangerschaften, Laktation und die Dauer der Einnahme von Ovulationshemmern protektive Faktoren darzustellen [6, 7].

#### **1.3.2.1. Familiäres Ovarialkarzinomrisiko**

5% der Ovarialkarzinome scheinen familiär gehäuft vorzukommen und treten meistens im früheren Lebensalter als die sporadischen Fälle auf [8]. Man unterscheidet hierbei das organspezifische familiäre Ovarialkarzinomsyndrom, das familiäre Mamma-/Ovarialkarzinomsyndrom, sowie das Lynch II-Syndrom. Diese Erkrankungen beziehen sich auf die Anwesenheit von vererbten autosomal-dominanten Mutationen in einem von zwei Genen, bekannt als BRCA1 (= engl. Breast cancer) und BRCA2. BRCA1 und BRCA2 sind Tumor-Supressor-Gene und sind auf Chromosom 17q beziehungsweise 13q lokalisiert.

Die Proteine der BRCA1 und BRCA2-Gene spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus und stehen im Zusammenhang mit Genaktivierung und DNA – Reparatur [9, 10]. Da die Mutationsallele von BRCA1- oder BRCA2-Genen von beiden Eltern vererbt werden können, ist es wichtig die ganze Familienanamnese zu erheben um das Erkrankungsrisiko abschätzen zu können.

Studien zeigen, dass die Mutationen in den BRCA1- und BRCA2-Genen sich in den verschiedenen Ländern unterscheiden [11] und in bestimmten ethnischen Gruppen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit vorkommen [12, 13].

Für Frauen mit Mutation in den BRCA1 oder BRCA2 Genen beträgt das Risiko in ihrem Leben Brustkrebs zu entwickeln bis zu 70%. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken beträgt 54% für BRCA1- und 23% für BRCA2-

Mutationsträgerinnen [9]. In der Allgemeinbevölkerung der Vereinigten Staaten ist das Risiko für ein Ovarialkarzinom 1,7 % [14]. Bei den Trägerinnen zeigt sich das Mammakarzinom meist früher als das Ovarialkarzinom, was eine große Rolle für die Früherkennung und Therapie des Ovarialkarzinoms spielt, das sonst meist erst in Spätstadien entdeckt wird. Andererseits ist das Kumulativrisiko ein Ovarialkarzinom nach einem Mammakarzinom zu entwickeln wie folgt: 1). 4,5% und 12,7% bei BRCA1 - Mutationsträgerinnen 5, beziehungsweise 10 Jahre nach der Diagnose von Brustkrebs; 2). 5,3% und 6,8% für die BRCA2 – Mutationsträgerinnen in den selben Zeitabständen [15]. Außerdem findet man bei 50% der BRCA1 - und bei 27% der BRCA2 – Mutationsträgerinnen Ovarialkarzinome ohne das Vorliegen eines Mammakarzinoms [16, 17].

Obwohl das Risiko für BRCA1- und BRCA2- Mutationsträgerinnen an einem Ovarialkarzinom zu erkranken nicht so hoch ist wie die Wahrscheinlichkeit für ein Mammakarzinom, ist es deutlich höher als das Risiko in der Allgemeinbevölkerung. Folglich ist solchen Patientinnen nach abgeschlossenem Kinderwunsch als sicherste Option zu einer Adnexektirpation zu raten.

Eine andere familiäre Erkrankung, die mit erhöhtem Ovarialkarzinomrisiko einhergeht, ist das Lynch Syndrom II. Es wird durch Keimbahnmutationen zum Beispiel in den DNA-Reparaturgenen verursacht, wie MSH2 (mutS Homologe 2) oder MLH1 (mutL Homologe 1) [18]. Bei den betroffenen Familien dominiert die HNPCC- Mutation des Gens (hereditäre nicht polipöse Kolonkarzinom). Beim Lynch Syndrom II ist ein Kolonkarzinom manchmal mit anderen Karzinomen assoziiert, wie denen des Endometriums, der Ovarien oder des Urogenitaltrakts.

#### 1.3.2.2. Tumorentstehung, Molekularbiologie

Das Ovarialkarzinom ist eine heterogene Erkrankung, die sowohl molekulare Veränderungen als auch histopathologische Besonderheiten einbezieht, wie die Wachstumsrate, das Metastasenpotential und die Radio- und Chemosensitivität [19]. Für die Entwicklung und Progression des Ovarialkarzinoms sind viele biologische und molekulare Faktoren wichtig, oder genauer gesagt – ihre Dysregulation. Es sind folgende Mechanismen bekannt: 1) Überexpression von Onkogenen, 2) Mutation oder Ausfall von Antionkogenen [20], 3) Wachstumsfaktoren und Zytokinstimulation,

4) Modifikation der Umwelt des Wirtes und seiner Reaktion gegen den Tumor [21]. Die weitgehende Mehrzahl der Ovarialkarzinome kommt allerdings sporadisch vor.

#### 1.3.2.2a. Onkogene

Onkogene sind Gene, die eine große Rolle bei der Initiation, Transformation und Progression von Tumoren spielen. Ihre Vorläufer sind die sog. Protoonkogene oder zellulären Onkogene (c-onc), deren Expressionsprodukte wesentliche physiologische Zellfunktionen, wie Signalerkennung, Signaltransduktion und Regulation von Proliferation und Differenzierung steuern. Unter den von Protoonkogenen kodierten Proteinen befinden sich: 1) Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, lokalisiert in der Zellmembran (meistens Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität), 2) Wachstumsfaktoren, 3) an DNA-bindende Proteine, lokalisiert im Zellkern, 4) GTP (Guanosin 5`Triphosphat)–bindende Proteine (z.B. ras-Protein). Eine Veränderung der Expression der Protoonkogene kann zu deren Aktivierung als Onkogene führen. Solche Aktivierungsmechanismen sind Genamplifikation, chromosomale Translokation, Punktmutationen und Integration einer nicht onkogenen Sequenz. Die Wirkung aktivierter Onkogene ist dominant, d.h. sie wird bereits manifest, auch wenn das zweite Allel nicht aktiviert ist.

#### 1.3.2.2b. Tumorsupressor- Gene

Die Tumorsupressor–Gene regulieren den Zellzyklus. Ihre Genprodukte wirken als Hemmstoffe des Zellwachstums, womit sie die Proliferation und Differenzierung der Zellen regulieren. Mutationen in diesen Genen führen zu unkontrolliertem Zellwachstum und so zur Tumorentstehung.

Es ist eine große Zahl an Tumorsupressor–Genen bekannt, die an der Ovarialkarzinomentstehung beteiligt sind, aber bislang konnte noch kein bestimmtes Gen identifiziert werden, das an diesem Prozess eine zentrale Rolle spielt. Eine Mutation des p53–Gen tritt als einer der führenden Kandidaten hervor. Diese Tumorsupressor–Gen–Mutationen werden häufig bei malignen Tumoren gefunden [22-25].

#### 1.3.2.2c. Wachstumsfaktoren und Zytokinstimulation

Die Entstehung und Entwicklung einer großen Gruppe menschlicher Tumore ist auch eine Folge abnormer Zellsignalvermittlung durch Wachstums- und Tyrosinkinaserzeptoren [26-30].

Tyrosinkinaserzeptoren sind eine Gruppe von Protoonkogenprodukten, die eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von wachstumsstimulierenden Signalen spielen. Sie sind integrale Membranproteine, die aus einer extrazellulären Ligandenbindenden Domäne, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosylresten bestehen [31]. Ihre Liganden sind Wachstumsfaktoren oder Hormone, deren Bindung die Dimerisierung des Rezeptors und die Autophosphorylierung seiner Tyrosylreste auslöst [32]. An den phosphorylierten Enden binden vier unterschiedliche Proteine: die PI-3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase), die Phospholipase C $\gamma$ , das GTPase-aktivierende Protein, sowie das Adapterprotein GRB2 (=engl. Growth factor receptor-bound protein). Diese verfügen über eine hierfür notwendige Domäne, die wegen ihrer strukturellen Verwandtschaft zur src-Kinase (Tyrosinkinase, deren Prototyp im Retrovirus Rous Sarcoma Virus identifiziert wurde) auch als SH2- Domäne (src homologe Domäne) bezeichnet wird. Das Adapterprotein GRB2 bindet ein als SOS (=engl. son of sevenless nach einem verwandten Protein bei Drosophila) bezeichnetes Protein, welches das kleine G-Protein (Guaninnucleotid – bindendes Protein) Ras aktiviert. Hieran schließt sich eine Kaskade von Proteinkinasen an, die eine Änderung der Genexpression und die Auslösung von Proliferation zur Folge hat. Eine Entfernung der Phosphatgruppen von den phosphorylierten Tyrosylresten dieses Rezeptors senkt die wachstumsstimulierende Aktivität dieses Signalwegs [33].

Es wurden viele Gruppen von Wachstumsrezeptoren beschrieben, deren abnorme Expression im engen Zusammenhang mit der Tumorentstehung und -entwicklung steht, hauptsächlich aus der Tyrosinkinaserzeptor-Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR = engl. epidermal growth factor receptors) Klasse I [34]. Diese Familie hat vier Mitglieder: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Tyrosinkinaserzeptor cerbB-2 (HER-2/neu), cerbB-3 (HER-3/neu) und cerbB-4 (HER-4/neu) [32, 35]. Die Proteine der cerbB-Familie sind normalerweise in Epithel-, Mesenchym- und Nervenzellen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei ihrem Wachstum und der Entwicklung [36-39].

Das *cerbB-1* Protoonkogen kodiert die Information für den EGFR, der auf normale Epithelzellen stark mitogen wirkt [40]. In 36-54% der Ovarialkarzinome wurde eine erhöhte Expression des EGFR gefunden [40]. Verschiedene EGF- ähnliche Faktoren (EGF-F) binden an den EGFR, einschließlich TGF- $\alpha$  (= engl. Transforming [tumor] growth factor). EGF (=engl. Epidermal growth factor) ist ein 6-kD-Glykoprotein mit TGF- $\alpha$  Strukturähnlichkeit. Ein erhöhter Spiegel wurde in 30% der Ovarialkarzinome beobachtet [40, 41].

## **1.4. HER-2/neu (= engl. Human Epidermal Growth factor receptor-2)**

### **1.4.1. Aufbau und Funktion von HER-2/neu**

Das HER-2/neu Protoonkogen wurde 1981 identifiziert [42]. Es befindet sich auf Chromosom 17q21 und kodiert für ein Transmembranglykoprotein von 185 kD (Kilodalton), das  $p185^{erbB2}$  oder HER2/neu genannt wird [36]. Dieses Gen zeigt eine hochgradig strukturelle Ähnlichkeit mit dem EGFR [43-46]. Dieses Protein hat eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität und eine extrazelluläre Ligand- Bindungsregion [36, 44]. Obwohl kein spezifischer Ligand für  $p185^{erbB2}$  identifiziert wurde, kennt man mehrere Glykoproteine, die mit dem  $p185^{erbB2}$  Rezeptor interagieren, wie Heregulin und NDF (= engl. New Differentiation Factor), GGFs (= engl. Glial Growth Factors), ARIA (= engl. Acetylcholine Receptor Inducing activity), NAF (= engl. Neu Activating Factor) [47-54]. Diese Liganden steigern die Tyrosinphosphorylierungsaktivität des HER-2/neu Rezeptors, fördern seine Dimerisation und das Wachstum der Zellen, die ihn exprimieren.

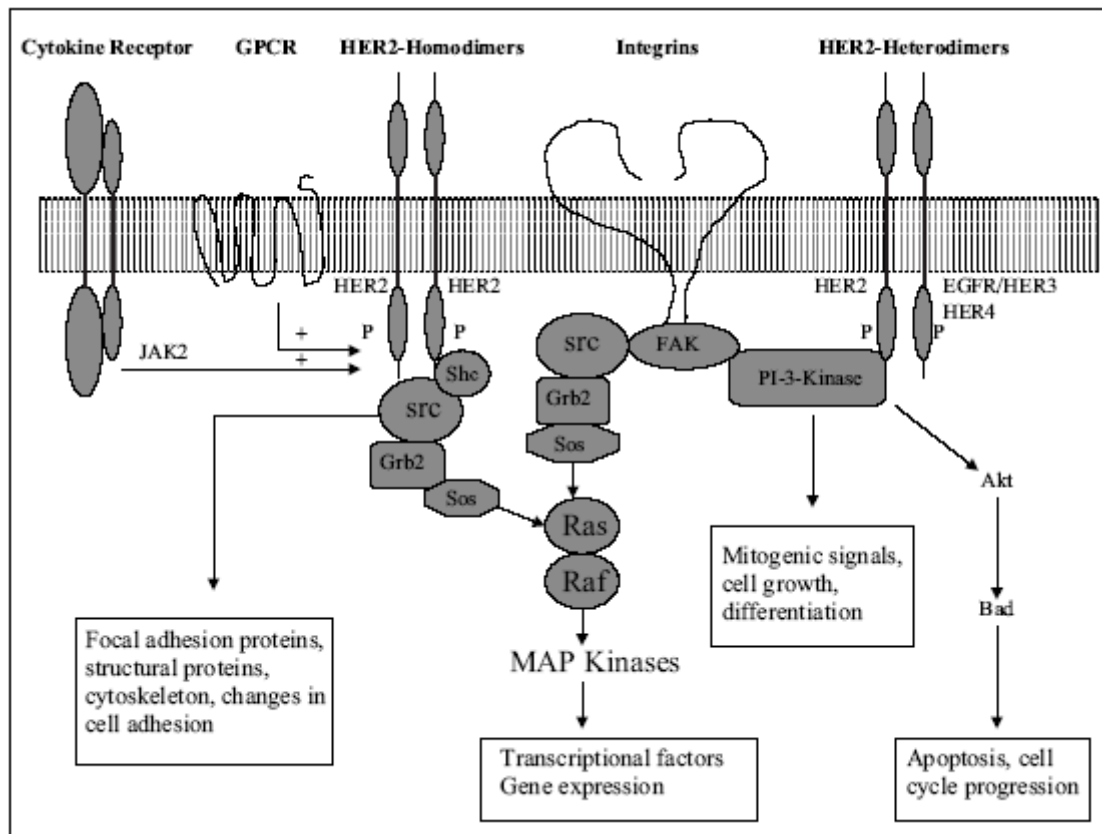
Die Fähigkeit der EGFR- Familienmitglieder Mono- und Heterodimere zu formieren, nachdem sie mit unterschiedlichen Liganden interagierten, erweitert die Vielfalt der Signale dieser Proteine [32, 41, 55, 56]. Es wird vermutet, dass HER-2/neu seine Signale nur durch Wechselwirkungen mit anderen aktivierten Mitgliedern der *erbB*-Familie vermitteln kann. In Ovarialkarzinomzellen aktiviert EGF überwiegend die Interaktion zwischen EGFR und HER-2/neu, während Heregulin (HRG) HER-3 als Monomer aktiviert.

Eine Heterodimerbildung zwischen EGFR und p185<sup>erbB2</sup> wurde auch in Mammakarzinomzellen beobachtet [57].

Eine Koexpression von EGFR und p185<sup>erbB2</sup> resultiert in einer synergistischen Transformation [58], aufgrund der erhöhten Ligandenbindungsaffinität und der katalytischen Kinaseaktivität [59, 60]. Eine Heterodimerbildung zwischen EGFR und p185<sup>erbB2</sup> führt ihrerseits zu einer gesteigerten Aktivität: 1) der Tyrosinphosphorylierung am intrazellulären Teil des HER-2/neu-Rezeptors, 2) der MAPK (=engl. Mitogen-Activated Protein Kinase), 3) der PI-3- Kinase und erhöht damit die Zellproliferation, was auch bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt [61]. Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Domänen der Proteine EGFR und p185<sup>erbB2</sup> bedingen verschiedene Signalergebnisse. Die Signalinduktion vom Heterorezeptor EGFR/ p185<sup>erbB2</sup> erfordert die Ektodomäne für eine ligandenabhängige physische Verbindung und den Kontakt zwischen den intrazellulären Domänen für eine effiziente intermolekulare Kinaseaktivierung [61].

In Ovarialtumoren werden verschiedene Prozentzahlen der Koexpression von EGFR und p185<sup>erbB2</sup> berichtet, beispielsweise fanden Skirnisdottir et al. [62] 11% Koexpression, Harlozinska et al. [63] bis zu 32% Koexpression. Diese unterschiedlichen Zahlen kann man sich durch verschiedene FIGO- Stadien der Karzinome erklären (fortgeschrittene Tumoren haben eine höhere Frequenz der Koexpression von EGFR und p185<sup>erbB2</sup>) und den unterschiedlichen Antikörpern, die bei der Immunhistochemie in den verschiedenen Studien benutzt wurden. Die beiden Rezeptoren scheinen unabhängig voneinander exprimiert, aber häufig kolokalisiert in denselben neoplastischen Zellen zu sein. Diese Tatsache ist wahrscheinlich biologisch relevant und trägt zu einem aggressiven Phänotyp bei, entsprechend dem wesentlichen Signalwechsel zwischen den beiden Rezeptoren [64].





**Abbildung 2.** Schematische Darstellung des HER-2/neu Signaltransduktionswegs [1]

Es wurden mehrere Wege der HER2/neu-vermittelten transmembranen Signalübertragung beschrieben [36]. Sehr wichtig ist der Ras-Signalübertragungsweg mit Aktivierung der MAP-Kinasen und der PI-3-Kinase. Der MAP-Kinase Mechanismus scheint beim Wachstum und der Transformation vieler Zellsysteme eine Rolle zu spielen [65]. Die Signalübertragungswege von vielen Tyrosinkinaserzeptoren, einschließlich HER-2/neu, c-src und ras konvergieren in die MAP-Kinasenkaskade. Zu den nachgeschalteten Substraten der MAP-Kinase zählen jun (aus dem Englischen: sarcoma virus 17 onkogen homolog), fos (aus dem Englischen: murine osteosarcoma viral onkogene homolog), myc (aus dem Englischen: myelocytomatosis viral onkogene homolog) und myb (aus dem Englischen: myeloblastosis viral onkogene homolog).

Das HER-2/neu Protein ist mit der PI-3-Kinase verbunden, wahrscheinlich mittels Heterodimerisation mit HER-3 [66]. Die PI-3-Kinase spielt eine wichtige Rolle in den Signalwegen der Zelle [67]. Zu ihren Funktionen zählen das Überleben der Zelle, die Zellsekretion, Differenzierung und das Wachstum.

Die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-src ist ein nachgeschaltetes Substrat für HER-2/neu. c-src kann viele fokale Adhäsionsmoleküle phosphorylieren, wie die fokale

Adhäsionskinase (FAK), Paxilline und p130 (Cas), sowie andere Strukturproteine einschließlich Catenine, Connexin und Tubulin.

#### **1.4.2. Die Rolle von HER-2/neu in Ovarialkarzinomen**

HER-2/neu ist primär ein Heterodimerpartner anderer Mitglieder der EGFR-Familie und kontrolliert das erB - Signalübertragungsnetzwerk, welches Zellwachstum und Differenzierung vermittelt. Die normalen Zellen haben zwei Kopien des Onkogens erbB2 und produzieren HER-2/neu in niedriger Konzentration. Eine zytoplasmatische und mitochondriale Expression von HER-2/neu wurde meist in normalen und viel seltener in Tumorzellen nachgewiesen, während die Membranexpression auf maligne Zellen beschränkt zu sein scheint [68, 69].

Eine Überexpression von HER-2/neu wurde in verschiedenen malignen Tumoren beschrieben, wie dem Mammakarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Endometriumkarzinom, dem Multiplen Melanom, dem Pankreaskarzinom, dem Kolonkarzinom und dem Hepatocellulären Karzinom [70-74].

Die meisten Studien haben die Effekte der HER-2/neu Überexpression im Mammakarzinom erforscht. Zu diesen Mechanismen gehören die Deregulierung der Transkription und die Genamplifikation [75-77]. Ein Mitwirken der Transkriptionsfaktoren von AP-2 und der Ets-Familie (aus dem Englischen: erythroblastosis viral oncogene homolog) wurde bei der HER-2/neu Überexpression in Brustkarzinomzellen entdeckt. Die AP-2 Transkriptionsfaktoren dysregulieren die HER-2/neu Expression mittels Binden an zwei Protoonkogenstellen: -213 bp [78] und -500 bp, aufsteigend an der Cap- Seite [79]. Die Ets-Transkriptionsfaktoren stimulieren die HER-2/neu Expression, indem sie die Formierung der Triplex-Struktur des Kernpromotors verhindern [80].

Im Ovarialkarzinom führen die Onkogenamplifikation von erbB-2 und die Deregulierung der Transkription zu einer Überexpression von HER-2/neu [81] und sie werden durch Mechanismen verursacht, die sich von denen in Mammakarzinomzellen unterscheiden.

In Studien wurde die Promotoraktivität des erbB-2-Protoonkogens durch Einschleusen von Reporter- Vektoren analysiert, die eine Deletion von einem 6 kb Promotorfragment enthalten. Es wurde gezeigt, dass diese Promotorfragmente in Brustkrebszellen aktiv sind und ihre Transkriptionsaktivität mit zunehmender Länge

des erbB2-Promotors steigt [82]. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde in Ovarialkarzinomzellen mit niedriger HER-2/neu Expression beobachtet. In Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Überexpression wurde eine erhöhte Transkriptionsaktivität bei dem p756-Promotorfragment nachgewiesen. Längere Fragmente führten zur Senkung der Aktivität bis zum Basiswert [69].

Es wird vermutet, dass andere Regulationssegmente, die außerhalb der zuvor genannten Promotorregion lokalisiert sind, die Expression von HER-2/neu in Ovarial- und Kolonkarzinomen beeinflussen. Möglicherweise spielen dabei Sequenzen in dem ersten Intron [83] oder 12 kb aufsteigend von der Anfangsstelle des erbB-2-Gens [84] eine wichtige Rolle.

Man sollte auch die Veränderungen in den vielfachen Regulationsstufen der erbB-2-mRNA- Transkription und der Proteinexpression beachten. Bei der Transkription z.B. wurden alternative erbB-2-mRNA-Fragmente beschrieben, die zur Expression von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen führen [85-88]. Auf der Ebene der Proteinexpression kann z.B. eine zusätzliche proteolytische Spaltung des HER-2/neu Proteins eine wesentliche Veränderung in seiner enzymatischen Aktivität verursachen [89-91].

Diese Daten zeigen, dass viele verschiedene Molekularmechanismen bei der Amplifikation, Transkription und den Posttranskriptionseignissen zu einer Überexpression von HER-2/neu führen und zwar nicht nur in Ovarialkarzinomzellen, sondern auch in den Zellen anderer maligner Tumoren.

## **1.5. Einteilung der Ovarialtumoren**

Die Ovarialtumoren werden nach der Klassifikation der WHO in drei histogenetisch unterschiedliche Hauptgruppen unterteilt: 1) epitheliale Tumoren, 2) Keimstrang-Stroma-Tumoren und 3) Keimzelltumoren. Da eine große Vielfalt an Untergruppen besteht, werden im Folgenden nur die wichtigsten genannt.

### **1.5.1. Epitheliale Ovarialtumoren**

Epitheliale Tumoren des Ovars stellen eine Proliferation des Müller-Oberflächenepithels und mit 60- 70% die größte Gruppe der Ovarialtumore dar. Sie kommen vorwiegend bei jungen Patientinnen vor, wobei die benignen und die an der

Grenze der Malignität stehenden (sogen. Borderline- Tumoren oder Karzinome mit geringem Malignitätspotential) epithelialen Ovarialtumoren häufiger bei Frauen zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr [92-94] und die malignen zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr auftreten.

Folgende Typen von epithelialen Ovarialtumoren werden beschrieben: seröse (55%), muzinöse (40%), endometroide (10%), Müller-Mischtumoren und Brenner-Tumoren (2%). 60% der serösen, 70% der muzinösen epithelialen Ovarialtumoren, sowie 99% der Brenner-Tumoren sind benigne. Endometroide Ovarialtumoren und Müller-Mischtumoren sind überwiegend maligne.

### **1.5.2. Keimstrang-Stroma-Tumoren des Ovars**

Hierbei handelt es sich um Tumoren des endokrin differenzierten Gonadenmesenchyms; sie machen ca. 5-10% der Ovarialtumoren aus. Keimstrang-Stroma- Tumoren sind in 85% der Fälle benigne und bestehen aus Granulosa- und Thekazellen, sowie aus Sertoli- und Leydig-Zellen, welche Östrogene, Gestagene und Testosteron bilden können. Deshalb werden sie als hormonbildende Ovarialtumoren bezeichnet.

Zu den Keimstrang- Stroma- Tumoren zählen die Granulosazelltumoren (die häufigsten Keimstrang- Stroma- Tumoren; 30% bilden Östrogene), Thekazelltumoren (sogen. Thekome, können Östrogene bilden), Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren (=Androblastome) und Gynandroblastome (selten; können Östrogene und Androgene produzieren)

### **1.5.3. Keimzelltumoren des Ovars**

Die Keimzelltumoren machen 10-20% aller Ovarialtumoren aus. Ein Vorkommen im Kindes- und Adoleszentenalter ist häufig. Da sie sich aus omnipotenten Keimzellen entwickeln, weisen sie eine große morphologische Vielfalt auf.

Die Teratome machen über 90% der Keimzelltumoren aus. Diese sind zu 99% benigne und differenzieren sich aus allen drei Keimblättern. Seltene Keimzelltumoren sind die Dysgerminome und die embryonalen Ovarialkarzinome (hochmaligne).

#### 1.5.4. Metastasen

10% aller Ovarialtumoren stellen Metastasen anderer Primärtumore dar. Häufig werden metastatische Absiedlungen von Karzinomen des Magens (Krukenberg-Tumor), der Mamma, der Tube, des Pankreas, der Gallenblase, sowie der Lungen und der Niere gefunden.

#### 1.6. Stadieneinteilung maligner Ovarialtumoren

Die Prognoseabschätzung und die Therapieauswahl für eine Patientin mit einem malignen Ovarialtumor erfordern die Bestimmung von Stadium (Staging), Differenzierungsgrad (Grading), histologischem Typ, sowie dem postoperativ verbliebenen Rest (R-Klassifikation) des Tumors. Wichtig sind auch die Zahl, Lokalisation und anteiliger Befall der untersuchten Lymphknoten, sowie die peritoneale Aussaat.

Die Stadieneinteilung ist entscheidend vom intraoperativen makroskopischen Befund und von seiner histologischen Bestätigung abhängig. Gebräuchlich beim Staging ovarialer Tumoren ist die TNM-Klassifikation. Die größte Zahl der Studien bezieht sich auf die klinisch orientierte FIGO (= engl. The International Federation of Gynecology and Obstetrics)- Stadieneinteilung.

GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
GB	Borderline- Malignität
G1:	gut differenziert
G2:	mäßig differenziert
G3- 4:	schlecht differenziert/ undifferenziert

**Tabelle 1.** Histologischer Differenzierungsgrad (Grading)

NX	<b>Regionäre Lymphknoten</b> können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten befallen (nur, wenn >10 untersucht wurden)
N1	Regionäre Lymphknoten befallen

**Tabelle 2.** Nodalstatus

pTNM	FIGO	
TX		<b>Primärtumor</b> kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Tumor
Tis	0	Carcinoma in situ (keine Infiltration der Lamina propria)
T1	I	Begrenzt auf Ovar
T1a	IA	Ein Ovar, Kapsel intakt
T1b	IB	Beide Ovarien, Kapsel intakt
T1c	IC	Kapselruptur, Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	IIA	Ausbreitung im Becken
T2a	IIA	Ausbreitung auf oder Implantate an Uterus, Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIC	Wie IIA oder IIB mit malignen Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und /oder N1	III	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens und/ oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung <2cm und/ oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3c und/ oder N1	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung >2cm und/ oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T4	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

**Tabelle 3.** TNM Klassifikation und FIGO-Stadien

MX	<b>Fernmetastasen</b> können nicht beurteilt werden
MO	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 4.** Fernmetastasen

RX	Residualtumor kann nicht beurteilt werden
RO	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

**Tabelle 5.** Residualtumor- Klassifikation

## 1.7. Prognose der Ovarialtumoren

Die Prognosabschätzung für Frauen mit Ovarialkarzinom ist ein wichtiger Teil der Evaluierung und der Therapieentscheidung. Sie basiert auf chirurgischen (FIGO-Stadium und postoperativ verbliebener Tumorrest) [95-100], histopathologischen (Grading [95, 97, 98, 100, 101] Tumortyp [97-100]) und klinischen Faktoren (Lebensalter bei Diagnosestellung [95-98, 102, 103], Anwesenheit oder Fehlen von Aszites [97, 98], Lymphknotenstatus [97], Ansprechen des Tumors auf postoperative Therapie) [104, 105].

Manche Faktoren haben eine größere Aussagekraft für die Prognose, wenn sie im Kontext mit anderen beobachtet werden, z.B. FIGO-Stadium und CA 12-5 [106], FIGO- Stadium und Tumorgrad [107], FIGO- Stadium und Histologie (insbesondere muzinös) [107], Tumorgrad und Histologie [108].

Eine große Zahl der Studien z.B. bestätigt das Konzept, dass Patientinnen mit endometroidem Ovarialkarzinom zum besseren Outcome neigen, als jene mit serösen, muzinösen, gemischten oder Klarzellkarzinomen [100, 109-112].

Die Langzeitüberlebensrate bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom kann in frühen Stadien (FIGO I und II) 80-95% und in fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV) nur 10-30% betragen [113, 114].

Die Identifikation von molekularen Markern als neue Prognosefaktoren kann von großer Bedeutung für die Verbesserung der Einschätzung des klinischen Outcomes sein und schließlich ein besseres Verstehen der Tumorbilogie von Ovarialtumoren bieten. Zusätzlich haben sie sich als wichtig bei der Voraussage für das Ansprechen auf bewährte Therapie erwiesen.

Es gibt eine wachsende Zahl an Studien über den Voraussagewert biofunktioneller Marker bei der Bestimmung der Prognose und des Therapieansprechens von Patienten mit epitheliale Ovarialkarzinom. So wurde die Bedeutung von Proliferationsmarkern (MIB-1, Ki-67), tumorassoziierten Genen und Proteinen (nm23, p53, HER-2/neu, CA 125 (=engl. Cancer Antigen 125), T2a) [115, 116], [117-122], [123-128], Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER und PR) [99, 129-131], DNA-Ploidie [99], Hitzeschock- Proteinen, CD44 und melanoma- assoziiertem Antigen (MAGE-4) weitgehend analysiert, sowie funktionelle und strukturelle Änderungen von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen [132] und die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

#### **1.7.1. Die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als prognostischer Faktor für Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Die Gesamtinzidenz von extraabdominalen Metastasen (Prädilektionsstellen sind Leber, Pleura, Lunge und Skelett) von Patientinnen mit Ovarialkarzinom beträgt, Autopsieergebnissen zufolge, annähernd 40% [133, 134]. Dies weist darauf hin, dass die hämatogene Disseminierung der malignen Zellen häufiger auftritt, als es den klinischen Untersuchungen nach zu erwarten wäre, was eine entscheidende Bedeutung für die Prognosebestimmung und die Therapie dieser Patientinnen hat.

Die Anwesenheit von Disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist mit einer niedrigeren Überlebensrate und häufigerem Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen bei Patientinnen mit Mammakarzinom assoziiert [135].

Für Ovarialkarzinompatientinnen gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen.



Um das Muster der Ausbreitung von Tumorzellen in Ovarialkarzinomen besser verstehen zu können, haben Braun et al. [136] in einer Studie mit 108 Patientinnen, die an Ovarialkarzinom erkrankt waren, versucht, disseminierte Ovarialkarzinomzellen im Knochenmark vor dem manifesten Auftreten von Metastasen und Rezidiven zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit einem signifikant häufigeren Auftreten von Fernmetastasen und tumorassoziertem Tod korreliert. Die prognostische Relevanz der Knochenmarksbefunde bestätigte sich auch in der multivariaten Analyse als unabhängiger Parameter.

Um disseminierte Ovarialkarzinomzellen im Knochenmark nachweisen zu können, wurden die monoklonalen Antikörper A45-B/B3 benutzt, die gegen häufige Zytokeratinepitope, einschließlich der CK-Heterodimere 8/18 und 8/19, gerichtet sind. Zytokeratine sind integrierte Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen, weswegen sie als Marker zur immunhistochemischen Detektion epithelialer Ovarialkarzinomzellen (60-70 % der Ovarialkarzinome) dienen. Die immunhistochemische Methodik mit den o.g. Antikörpern weist eine hohe Spezifität auf und kommt in der Mehrzahl der Studien zum Einsatz.

Alternativ dazu existieren PCR- und FISH- Analysen, die allerdings aufgrund der guten Spezifität und dem im Vergleich geringeren Aufwand der immunhistochemischen Untersuchungen, von untergeordneter Bedeutung sind.

Die Verwendung von monoklonalen Antikörper gegen die Cytokeratinisomere kann zu deren Down-Regulation in den Tumorzellen führen und dadurch die Sensitivität der Nachweismethode beeinträchtigen. Vermutlich kann die Sensitivität durch die Verwendung eines Panzytokeratin-Antikörpers verbessert werden. Es bleibt bis dato unklar, welche Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Tumorzellen am besten geeignet sind.

Ein ebenfalls noch zu klärender Punkt in der Nachweismethodik ist die mikroskopische Detektion der Zellen. Derzeit sind vor allem die Systeme der amerikanischen Firmen Chromavision und Applied Imaging im Einsatz. Das System MDS<sup>®</sup> der Firma Applied Imaging befand sich von September 2001 bis Ende 2002 im tumorimmunologischen Labor der Universitätsfrauenklinik an der Maistrasse in Erprobung und lieferte zuverlässige Ergebnisse. Der hier verwendete Testansatz ist eine der derzeit am besten validierten nichtmolekularen Nachweismethoden für hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark [137, 138].

In dieser Arbeit soll zusätzlich die Beziehung zwischen dem HER-2/neu Status und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen in Knochenmark, sowie ihre prognostische Relevanz als unabhängige und/oder assoziierte Prognosefaktoren, an einer Serie von Ovarialkarzinompatientinnen bestimmt werden.

#### **1.7.2. HER-2/neu als prognostischer Faktor für Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

In den letzten Jahren haben viele Studien die prognostische Bedeutung der HER-2/neu- Amplifikation und Überexpression in verschiedenen menschlichen Karzinomen, einschließlich des Ovarialkarzinoms, beschrieben. Die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich, zum Teil auch widersprüchlich [3, 4, 45, 81, 139-146].

Um die prognostische Bedeutung von HER-2/neu zu kategorisieren wurden uni- und multivariate Analysen durchgeführt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass HER-2/neu nicht als ein unabhängiger prognostischer Faktor zu bewerten ist, sondern in Verbindung mit anderen Faktoren gesehen werden muß [81, 147].

Biomarker, die bei der Medikamentenresistenz eine direkte Rolle spielen, sowie Multidrugresistenz und Entgiftung verursachende Proteine wurden außerdem als Indikatoren für das klinische Outcome getestet [148, 149]. Infolge der genannten biologischen, pathologischen und klinischen Heterogenität der Ovarialtumoren, sind dennoch Endergebnisse und Deutung von verschiedenen Studien oft mehrdeutig.

Die Identifikation von neuen prognostischen Faktoren kann sehr nützlich für die Therapie der Ovarialkarzinome und für die Intensivierung der Nachsorge bei bestimmten Patientengruppen sein und trägt dazu bei, das biologische Verhalten der Ovarialkarzinome besser verstehen zu können.

## **1.8. Symptome und Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms**

Die Symptome des Ovarialkarzinoms sind oft unspezifisch. In den Frühstadien der Ovarialkarzinome haben die meisten Patientinnen keine klinischen Symptome. In einigen Fällen kommt es zu einer Stieldrehung des Ovarialkarzinoms, das sich in plötzlich auftretenden Unterbauchschmerzen äußert.

Begleitende Befunde bei der körperlichen Untersuchung können Aszites, Pleuraerguss und umbilikale Tumormassen sein. Die häufigste extraabdominelle Manifestation ist der Pleuraerguss, obwohl gelegentlich auch eine Beteiligung des Lungenparenchyms beobachtet werden kann. Zu den paraneoplastischen Phänomenen zählt die Hyperkalzämie, die in Verdacht auf Assoziation mit Klarzellovarkarzinomen auftritt [150], und die von den anti-Purkinjezellen- Antikörpern verursachte subakute Kleinhirndegeneration [151]. Als Vorboten der Ovarialkarzinomentwicklung wurden das Leser-Trelat Zeichen (die plötzliche Erscheinung einer seborrhoischen Keratose) [152], das Trousseau'sche Syndrom (die wandernde oberflächige Thrombophlebitis) [153], die Dermatomyositis [154], die Polyarthrititis und die Palmarfasciitis beobachtet [155].

Wenn aufgrund der Symptome und der körperlichen Untersuchung der Verdacht auf ein Ovarialkarzinom besteht, wird oft die transvaginale Ultraschalluntersuchung zur Beurteilung des Beckens durchgeführt. Diese scheint bei der Erkennung von Beckenmassen sensitiver zu sein als eine CT (= engl. Computed tomographic)-Untersuchung und liefert qualitative Information über den Tumor, was sehr nützlich bei den weiteren Therapieentscheidungen ist [156, 157]. Besonders der Befund einer komplexen Ovarialzyste, die aus zwei Komponenten (zystischer und solider) besteht und manchmal eine Septierung aufweist, ist hochverdächtig auf Karzinom. Solche Zysten benötigen typischerweise die operative Intervention zur definitiven Diagnosestellung. Eine perkutane Biopsie der komplexen Zysten sollte vermieden werden wegen des Risikos einer Tumorzellenstreuung in die Beckenhöhle. Im Gegensatz dazu haben einfache Ovarialzysten glatte Wände, sind mit Flüssigkeit gefüllt und enthalten keine soliden Komponenten. Diese Zysten sind oft gutartig und benötigen im Allgemeinen keine unmittelbare chirurgische Intervention. Trotzdem wird eine sorgfältige Kontrolle empfohlen [157].

Der Serumspiegel von CA-125 (= engl. Cancer-Antigen 125) ist in 80% der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erhöht. Diese Messung allein

reicht jedoch nicht zur Diagnosestellung, weil sie weder ausreichend sensitiv, noch genügend spezifisch ist. Der Serumspiegel von CA-125 kann auch bei einer Schwangerschaft, Endometriose, Adenomyose, Uterusmyomen, Menstruation, Beckenentzündungen und gutartigen Zysten, sowie bei anderen malignen Tumoren, wie Pankreas-, Mamma-, Lungen-, Magen- und Kolonkarzinom erhöht sein. Somit ist die Messung des CA-125-Spiegels für die präoperative Evaluation von komplexen Ovarialzysten nur von eingeschränkter Bedeutung. Trotzdem sollte man bei einem Wert von CA-125 über 65 U/ml bei postmenopausalen Frauen mit Abdomen- oder Beckenmassen differenzial-diagnostisch an Ovarialkarzinom denken [158]. Der CA-125-Spiegel wird zur Beurteilung des Ansprechens auf die postoperative Chemotherapie und zur Erkennung von Frührezidiven bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom genutzt [159].

## **1.9. Therapie der Ovarialkarzinome**

Die Therapie der Ovarialkarzinome besteht aus mehreren Teilbereichen:

- 1). Operative Therapie
- 2). Chemotherapie
- 3). Strahlentherapie
- 4). Hormontherapie
- 5). Immuntherapie

Die radikale primäre Operation und die aggressive Kombinationschemotherapie stellen die beiden Säulen im modernen Behandlungskonzept des Ovarialkarzinoms dar. Eine denkbare Alternative zur Chemotherapie ist die primäre adjuvante Strahlentherapie nach einer radikalen Operation. Die Immuntherapie und die Hormontherapie sind neu erforschte Therapiemöglichkeiten.

### **1.9.1. Operative Therapie**

Besteht der Verdacht auf Ovarialkarzinom, wird eine explorative Laparotomie zur Tumorentfernung, histologischen Befundbestimmung und Stadienbeurteilung durchgeführt.

Die möglichst vollständige Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes schafft die Voraussetzung für einen optimalen Wirkungsgrad der Polychemotherapie. So zeigt sich, dass der verbliebene Tumorrest bei der Primäroperation einen wichtigen prognostischen Parameter für das Überleben beim Ovarialkarzinom darstellt [160]. Die Bestimmung des histologischen Tumortyps ist notwendig, um zusätzliche prognostische Information zu liefern, aber auch, um andere Ätiologien komplexer Ovarialzysten (wie nichtepitheliales Ovarialkarzinom, Ovarmetastasen aus anderen Primärtumoren [z.B. Krukenberg Tumor] oder gutartige [z.B. endometroide] Ovarialzysten) auszuschließen [161-163]. Die Bestimmung des postoperativen FIGO-Stadiums des Ovarialkarzinoms liefert wichtige Information für die Entscheidung der weiteren Therapiekonzepte, besonders in den frühen Stadien des Ovarialkarzinoms.

Die operative Standardmethode beginnt mit einem Mittellinienlängsschnitt, um eine ausreichende Freilegung des oberen Abdomens und des Beckens zu ermöglichen. Üblicherweise werden eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie, Omentektomie und Peritonealspülung durchgeführt. In jedem Fall soll die gesamte Peritoneumoberfläche sorgfältig nach sichtbaren Tumorabsiedlungen abgesucht werden. Eine Lymphonodektomie kann in allen Stadien des Ovarialkarzinoms sinnvoll sein. In den Frühstadien werden die beidseitige Entfernung der pelvinen Lymphknoten und die Biopsie suspekter paraaortalen Lymphknoten empfohlen [164, 165]. In den fortgeschrittenen Tumorstadien ist in mindestens 50% der Fälle mit einem Tumorbefall der pelvinen und der paraaortalen Lymphknoten zu rechnen, was deren Entfernung erforderlich macht [166].

Darm- und/oder urologische Eingriffe können unter Umständen (z.B. FIGO IIIc, IV) erforderlich werden.

Obwohl die primäre Operation die Therapie der Wahl beim Ovarialkarzinom ist, gibt es Patientinnengruppen, für die alternative Vorgehensweisen bedacht werden sollten. Das laparoskopische Staging zum Beispiel kann sehr hilfreich bei der Evaluation der Operabilität sein [167]. Eine zweite Gruppe stellen Patientinnen mit Ovarialkarzinom dar, bei denen wegen des Vorliegens anderer Erkrankungen keine Operation durchgeführt werden kann. In solchen Fällen wird die sogen. zytoreduktive Chemotherapie vorgezogen. Beim Ansprechen auf diese Behandlungsmethode und

gutem Allgemeinzustand kann bei der Patientin nach drei Zyklen Chemotherapie eine operative Intervention vorgenommen werden [168].

Bei primär inoperablen Ovarialkarzinomen wird eine neoadjuvante Chemotherapie mit sekundärem Tumordebulking empfohlen [169].

### **1.9.2. Chemotherapie**

Bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms hat heute die Chemotherapie einen besonderen Stellenwert.

Die Ansprechrate und Effektivität der Chemotherapie bei Ovarialkarzinomen hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab:

- 1). der Tumorbilogie (Tumorgrad und histologischer Tumortyp),
- 2). der Art und des Zeitintervales zu einer eventuellen (zytostatischen) Vorbehandlung,
- 3). Der Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrestes.

Die Effektivität der Chemotherapie nimmt nicht linear, sondern exponentiell zur Größe des verbliebenen Resttumors zu. Deshalb ist die primäre radikale Tumorreduktion/Tumorentfernung die Voraussetzung für einen optimalen Wirkungsgrad der Chemotherapie.

Es wurde festgestellt, dass Patientinnen, die auf eine First-line Chemotherapie nicht angesprochen haben, signifikant häufiger Ovarialtumoren mit einer HER-2/neu Überexpression hatten [170].

Je nach Indikation lassen sich die folgenden Chemotherapietypen unterscheiden:

- 1). neoadjuvante (Induktions-) Chemotherapie mit nachfolgendem Versuch der operativen Entfernung des Resttumors nach Remission (Interventionslaparotomie),
- 2). adjuvante Chemotherapie nach kompletter operativer Entfernung allen sichtbaren Tumorgewebes zur Beseitigung der mikroskopischen Tumorreste (kurativer Ansatz) [171],
- 3). palliative Chemotherapie zur Reduktion der Tumorgröße (Remission), Verbesserung der Lebensqualität und zur eventuellen Lebensverlängerung.

Die meisten Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom erhalten eine postoperative adjuvante Chemotherapie, damit alle möglichen Tumorreste beseitigt werden können. Klinische und experimentelle Daten weisen darauf hin, dass bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom FIGO IA, G2 (Tumorgrad 2) oder FIGO IB, G1/2, nach einer alleinigen primären Operation, die 5-Jahres-Überlebensrate 90-95% beträgt und durch eine postoperative Chemotherapie nicht verbessert wird [113, 172]. Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in den Frühstadien und einem hohen Rezidivrisiko (das heißt: FIGO IC; FIGO I, G3; FIGO II) kann eine Kombinations- Chemotherapie mit Cyclophosphamid und einer platinhaltigen Substanz (z.B. Cisplatin oder Carboplatin) die rezidivfreie Lebenszeit deutlich verlängern [172, 173]. Untersuchungen zeigen, dass der Ersatz von Cyclophosphamid durch Paclitaxel oder Docetaxel in der Kombination mit Cis- oder Carboplatin der ursprünglichen Kombinations-Chemotherapie statistisch signifikant überlegen ist und zu längeren progressionsfreien Zeiten als auch Überlebenszeiten führt [174, 175].

Die intravenöse Verabreichung von taxan- und platinhaltiger Chemotherapie ist die derzeitige postoperative Standardbehandlung für Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom. Platin-Analoga, wie Carboplatin und Cisplatin, vermitteln ihren Effekt, indem sie Formationen mit DNA innerhalb der Stränge bilden. Im Gegensatz dazu besteht der zytotoxische Effekt von Taxanen wie Paclitaxel und Docetaxel darin, an Tubulin-Polymere zu binden und sie zu stabilisieren. Die Kombinations-Chemotherapie mit Paclitaxel und Cisplatin verlängert die progressionsfreien und die Gesamtüberlebenszeit bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom im Vergleich zu früher angewendeten Schemata, die Taxane nicht einschlossen [114, 176]. Der Einsatz von Paclitaxel scheint zu einer Reduktion des Mortalitätsrisikos um 30% zu führen. Die Kombination von Paclitaxel und Carboplatin als First-line Chemotherapie zeigte einen ähnlichen therapeutischen Effekt wie die von Paclitaxel und Cisplatin, verursachte aber weniger Emesis, Leukopenie und Nephropathie [177, 178].

Mehr als 50% der Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom, die eine Kombinations-Chemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin bekommen haben, zeigen eine komplette klinische Remission [114, 177]. Annähernd 20-30% der Patientinnen erreichen keine klinische Remission trotz der aggressiven First-line Chemotherapie. Bei diesen Patientinnen spielen meistens folgende Faktoren eine große Rolle: ein fortgeschrittenes Tumorstadium, Alter > 65 Jahre, unvollständige

Tumorresektion, Klarzellkarzinom und hoher CA-125 Serumspiegel auch nach drei Zyklen Chemotherapie [160].

### **1.9.3. Strahlentherapie**

#### **1.9.3.1. Adjuvante Strahlentherapie**

Die adjuvante Strahlentherapie wird im Vergleich zur Chemotherapie derzeit selten eingesetzt. Früher wurde eine Ganzabdomen- Bestrahlung (GAB) durchgeführt, die nur bei postoperativen Tumorresten von weniger als 4mm maximalem Durchmesser für sinnvoll erachtet wird. Das Durchführen der GAB ist wegen der Langzeittoxizität nicht mehr üblich.

#### **1.9.3.2. Palliative perkutane Strahlentherapie**

Eine Indikation zur palliativen Strahlentherapie können umschriebene Rezidive, insbesondere im Becken, darstellen. Bei etwa 70% der Patientinnen kann ein Ansprechen des Tumors, vor allem bezüglich Schmerzen, Blutungen und neurologischer Symptome, erwartet werden.

### **1.9.4. Hormontherapie**

Obwohl auf Ovarialkarzinomzellen, ähnlich wie beim Mammakarzinom, Östrogen- und Gestagenrezeptoren gefunden werden, ist der genauere Stellenwert der Hormontherapie im Rahmen der Behandlung der Patientinnen mit Ovarialkarzinom bis heute unklar. Die Anwendung von Antiöstrogenpräparaten (Tamoxifen) konnte in randomisierten Studien einen antiproliferativen Effekt bei Ovarialtumoren zeigen, der jedoch bei einer Langzeitbehandlung mit dieser Substanz abnimmt [179]. Aufgrund der niedrigen Remissionsraten, trotz eines hohen Prozentsatzes von Tumorzellen mit Nachweis von Östrogenrezeptoren, findet die Therapie mit Tamoxifen bei Ovarialtumor- Patientinnen kaum Einsatz.

Hingegen konnte durch den Einsatz von GnRH-Analoga zur Behandlung ausgedehnter rezidivierender Ovarialkarzinome eine Teilremission beobachtet werden.



### **1.9.5. Immuntherapie**

Die gezielte Therapie gegen biologische Tumorbestandteile ist ein essenzieller Teil der individualisierten Therapiekonzepte des Ovarialkarzinoms. Neben der Operation und der Chemotherapie, bietet sich die Antikörperanwendung als eine zusätzliche Therapieoption.

Zu der Immuntherapie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen stehen folgende Präparate zur Verfügung [180]:

- 1). Parenterale Gabe von Antikörpern gegen Tumorantigene und Tumorrezeptoren (z.B. CA 125, HER-2/neu);
- 2). Aktive Immunisierung (Vakzination) mit autologen, gereinigten Tumorzellen [181, 182];
- 3). Gabe von mit Chemotherapeutika, Toxinen oder Isotopen (Radioimmuntherapie) konjugierten Antikörpern.

Ergebnisse, die zeigen, dass der HER-2/neu Rezeptor in den Zellen einiger Tumortypen überexprimiert ist, und die Annahme, dass dies zur Zelltransformation und Tumorgenese geführt haben könnte, geben neue Anregungen für Therapiekonzepte. Spezifische Antikörper, die die Signaltransduktion der HER-2/neu Tyrosinkinase inhibieren, können das Wachstum von Tumoren, die das HER-2/neu Gen exprimieren, verhindern.

Grundsätzlich kann die Signaltransduktion des HER-2/neu Rezeptors auf verschiedenen Stufen inhibiert werden:

- 1). Stufe der Ligandenbindung (Rezeptor-Stufe)
- 2). Intrazelluläre Stufe
- 3). Transkriptions- und Genstufe.

#### **1.9.5.1. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der Stufe der Ligandenbindung**

Es existieren eine Reihe von monoklonalen Antikörpern, muMAb (= engl. Murine Monoklonal Antibodies), die gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors gerichtet sind. Die besten Ergebnisse erhielt man durch muMAb 4D5, die in vitro einen direkten antiproliferativen Effekt gegen menschliche Mammakarzinom-

Zelllinien mit HER-2/neu Überexpression haben [183], ohne jene Zellen anzugreifen, die dieses Protein nicht überexprimieren [184].

Die humanisierte Variante von muMAb 4D5 entstand durch Integration von Regionen von muMAb 4D5 ins Gerüst von menschlichem IgG1 (Immunoglobulin G1) [185]. Trastuzumab (Herceptin®), der daraus resultierende Antikörper, bindet an die extrazelluläre Domäne von HER-2/neu mit einer drei Mal größeren Affinität als der primäre muMAb 4D5. Dies führt zur Suppression der HER-2/neu induzierten Transformation und beeinflusst das Tumorstadium und die Signaltransduktion durch: 1). Antikörper abhängige, Zell - vermittelte Zytotoxizität, 2). Down- Regulation von HER-2/neu Rezeptor vermittelten Prozessen, 3). Hemmung der Heterodimerisation von HER-2/neu mit anderen Mitgliedern der EGFR- Familie und 4). Suppression der Zellprogression durch Induktion von p27Kip1 (Cyclin abhängigem Kinasehemmer) [186-190].

Die synthetisch produzierten Antikörper, die an HER-2/neu binden, können eine agonistische oder eine antagonistische Wirkung haben. Wenig weiß man jedoch davon, wie die endogenen Antikörper die HER-2/neu Aktivität modulieren.

Eine Reihe von Forschungsgruppen haben gezeigt, dass Patienten mit HER-2/neu überexprimierenden Tumoren endogene Antikörper gegen diesen Rezeptor bilden [191-193]. Eine Impfung mit HER-2/neu-Peptiden führt zur Bildung von Anti- HER-2/neu-Antikörpern (überwiegend IgG3). Diese Antikörper können erfolgreich die HER-2/neu Phosphorylierung inhibieren, die gut mit der Suppression der nachgeschalteten ERK (= engl. Extracellular signal-regulated kinase) und der anschließenden Suppression der Proliferation korreliert [194].

Trastuzumab ist die erste neue gezielte Antikörpertherapie, die für die klinische Routineanwendung bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen zugelassen ist. Patientinnen mit HER-2/neu Proteinüberexpression und/oder Genamplifikation in ihren Tumorzellen sprechen gut auf die Trastuzumab-Therapie an, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie [195].

Aufgrund der Wirksamkeit bei Mammakarzinomen, einem nachgewiesenen Zusammenhang auch zwischen HER-2/neu Überexpression und Ovarialkarzinomentwicklung und dem Interesse an einer Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapie, wurde auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom das Ansprechen auf Herceptin überprüft.

Bookman et al. [196] berichten von einer Gesamtansprechrate von 7,3% auf eine Behandlung mit Herceptin in Kombination mit Chemotherapie [197].

Die Behandlung mit Trastuzumab wird insgesamt gut toleriert. Die häufigsten Toxizitäten die beobachtet wurden waren Anämie, gastrointestinale Störungen, Neuropathie und Müdigkeit [196]. Die schwerste Nebenwirkung ist die Kardiotoxizität [1].

Bis dato hat Trastuzumab dennoch keine klinische Anwendung außerhalb von Studien bei Ovarialkarzinompatientinnen gefunden, weder als Monotherapie, noch in Kombination mit Chemotherapie [196].

#### 2.9.5.2. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der intrazellulären Stufe

Die neoplastischen Zellen sind durch eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität gekennzeichnet, welche deswegen als Ziel der Tumorthherapie sinnvoll erscheint [198]. Die meist verwendbaren Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität leiten sich von jeder der folgenden Molekülgruppen ab: Quinazolin, Pyrido- Pyrimidin und Pyrolo- Pyrimidin. Diese binden an ATP und/oder ihre Substrate.

ZD1839, eine Substanz von der Gruppe der Quinazolin, zeigte eine ausreichende und wirksame Hemmung der EGFR- Tyrosinkinase, sowie der EGF abhängigen Proliferation und Angiogenese in menschlichen Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien. Dieser Effekt war ausgeprägter bei der Kombination von ZD1839 mit herkömmlichen zytotoxischen Medikamenten, wie Cisplatin, Paclitaxel, Doxorubicin und Topotecan [199, 200].

Ein anderer Inhibitor der HER-2/neu-Tyrosinkinase ist Emodin. Emodin supprimiert die Autophosphorylierungs- und die Transphosphorylierungs-Aktivität von HER-2/neu [201].

Eine andere Möglichkeit, die Wirkung der Tyrosinkinasen zu hemmen ist die Inhibition ihrer nachgeschalteten Signalproteine (z.B. scr, MAP- Kinase, PI-3- Kinase) mittels Pyrazolo-Pyrimidine wie PP1 und Pyrolo-Pyrimidine wie CGP77675 [202, 203].

Zu den potentiellen Strategien der intrazellulären Therapie von HER-2/neu-exprimierenden Tumoren gehört auch die gezielte intrazelluläre Medikamentenzufuhr

(z.B. die doxorubicin-geladenen Anti-HER-2/neu- Immunoliposomen [anti-HER2/ILs-Dox]).

#### 2.9.5.3. Inhibition der Signaltransduktion von HER-2/neu auf der Transkriptions- und Genstufe

Die Hemmung eines nachgeschalteten Signalkaskaden-Proteins der HER-2/neu-Tyrosinkinase könnte für die totale Aufhebung des onkogenen Effekts von HER-2/neu nicht ausreichend sein. Deshalb ist es wahrscheinlich effektiver die HER-2/neu-Expression zu hemmen.

Dies kann durch die Anwendung von synthetischen Oligonukleotiden oder Antisense- DNA-Konstrukten, die an die mRNA von HER-2/neu binden und dadurch die Proteinbiosynthese verhindern, erreicht werden. Der Vorteil dieser Methode ist die gezielte Inhibition der HER-2/neu Expression und Proliferation in vitro. In vivo aber sind die Oligonukleotide sehr instabil.

Eine andere Methode, die HER-2/neu Expression zu hemmen, ist die gezielte Blockade seines Promotors, die nicht nur mittels zellulärer, sondern auch mittels einer Reihe von viraler Transkriptionsfaktoren erreicht werden kann. Unter den zuletzt genannten befindet sich der Adenovirustyp 5 E1A (=engl. Early region 1A gene product). E1A kodiert für ein Protein, das für die Adenovirusreplikation nach der Zellinfektion benötigt wird, um die Virusabwehr dieser Zellen und des Wirtes zu supprimieren. Für die Aktivierung des HER-2 Genpromotors ist die Bindung eines Transkriptionsfaktor p300 notwendig. E1A kann an p300 binden und damit seine Funktion hemmen, was zur Repression der HER-2/neu-Genpromotor-Aktivität führt. Eine Phase I klinische Studie über die E1A- Gentherapie mit Anwendung von kationischen Liposomen bei Mamma- und Ovarialkarzinomen mit HER-2/neu-Überexpression wurde im Anderson Cancer Center, Houston, TX durchgeführt [204, 205].

Die unterschiedlichen Methoden der Immuntherapie des Ovarialkarzinoms werden in zahlreichen Studien untersucht, ihre klinische Anwendung ist aber noch hypothetisch. Derzeit wird bereits die intraperitoneale Gabe von TNF (Tumor Nekrose Faktor) und IL-2 (Interleukin-2) zur Behandlung des rezidivierenden malignen Aszites bei austherapierten Patientinnen eingesetzt. TNF und IL-2 führen zur

Rückbildung des Aszites, jedoch nicht zu einer Rückbildung des Tumors. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen (Fieber, Schüttelfrost, allergische Reaktionen u.a.) kann der routinemäßige Einsatz dieser Therapieform nicht empfohlen werden.

Der Einsatz von Anti-Tumor-Antikörpern in der Therapie des Ovarialkarzinoms bleibt als wichtiges Ziel für weitere Forschungen.

## **2. Ziele der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Korreliert die HER-2/neu Proteinüberexpression mit der HER-2/neu Genamplifikation?
- Korreliert die HER-2/neu – Überexpression mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Knochenmark?
- Wie ist die prognostische Relevanz der Präsenz hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark
- Wie ist die prognostische Relevanz der HER-2/neu Proteinüberexpression und Genamplifikation bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom?

Um dies zu beantworten wurde zum einen der Primärtumor auf HER-2/neu mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung untersucht und zum anderen der immunhistochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark durchgeführt.

Die Klärung der erwähnten Fragestellungen führt erstens zu einer Verbesserung des Verständnisses des biologischen Verhaltens der Ovarialkarzinome und zweitens zur Beurteilung des Stellenwertes von HER-2/neu als prognostischer Faktor für Ovarialkarzinome und als potentielles Target zielzellgerichteter Therapie.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Patienten**

Für diese Dissertation wurden Patientinnen ausgewählt, die eine Primäroperation bei Ovarialkarzinom an der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der LMU München erhalten haben. Die Ausarbeitung der OP-Präparate war am histopathologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Maistraße durchgeführt worden. Zusätzlich mussten die Patientinnen eine Knochenmarkspunktion im Rahmen der Primäroperation erhalten haben. Es fanden sich 89 Patientinnen, von denen sowohl Tumorgewebe (in Paraffin eingebettet) als auch die Knochenmarksbefunde zur Verfügung standen. Von den Tumorparaffinblöcken jeder Patientin wurden sechs 4 bis 6 Mikrometer dicke Schnitte auf Objektträger fixiert, die für die Durchführung von FISH (Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung) und IHC (Immunhistochemie) benutzt wurden.

#### **3.2. Material**

##### **3.2.1. Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.a. und stammen, falls hier nicht namentlich aufgeführt, von den Firmen Merck, Biochrom, Braun, Vysis.

Xylol	Firma Merck, Darmstadt
12N HCl	Firma Merck, Darmstadt
100%, 96%, 70% EtOH	Firma Merck, Darmstadt
10% gepuffertes Formalin	Firma Merck, Darmstadt
4% Formaldehyd	Firma Merck, Darmstadt
Citronensäure	Firma Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Firma Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Firma Merck, Darmstadt
Aqua dest steril	Firma Braun, Melsungen
PBS	Firma Biochrom, Berlin

---

SSC	Firma Vysis, USA
Np40	Firma Vysis, USA
Hämatoxilin und Eosin	Klinikapothek nach Rezept nach Romeis
Eosin 1B 423	Chroma-Gesellschaft, Köngen
DAB	Firma VECTOR, Burlingame, USA
Hanksche Lösung	Firma Biocrom, Berlin
Ficoll-Hypaque, Dichte 1,077 g/ml	Pharmacia, Freiburg
Trypanblau	Firma Chroma, Stuttgart
Trislösung	Firma Sigma, Deisenhofen
Na NO <sub>2</sub>	Firma Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Firma Serva, Heidelberg
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Firma Sigma, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Firma Sigma, Deisenhofen
Levamisole (L-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phenylimidazol 2,1-b thiazole)	Firma Sigma, Deisenhofen

### 3.2.2. Kits

PathVysion™ HER-2 DNA Sonden – Kit ( LSI® HER-2/neu Spectrum Orange™ /CEP® 17 Spectrum Green™)	Firma Vysis, Downers Grove, USA
Paraffin Vorbehandlungs-Reagens-Kit	Firma Vysis, Downers Grove, USA
Mounting Medium for Fluorescence (with DAPI) H – 1200	Firma VECTOR, Burlingame, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein	Firma DAKO®, Carpinteria, USA
Vectastain® ABC Kit	Firma VECTOR, Burlingame, USA
DAB Substrat Kit	Firma VECTOR, Burlingame, USA
Mouse monoclonal antibody A45-B/B3 APAAP, Mouse Monoclonal	Firma Micromet, München
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin, Z 0259	Firma DakoCytomation, Dänemark
MOPS-21	Firma Sigma, Deisenhofen



### 3.2.3. Geräte

Wasserbäder: 37 °C	Firma Julabo U3
120 °C	
Umluft-Brutschrank	Firma Lauda E100
Feuchtkammer zur Hybridisierung	Firma Memmert
pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Firma Vysis
Magnetrührer	Firma UniTec GmbH
Heizplatte	Firma IkaMag® Ret
Mikrotom	Firma Rommelsbacher
Hettich Zentrifuge Universal 30 F	
Neubauer Zählkammer	

### 3.2.4. Mikroskopausrüstung und Zubehör

Mikroskop HBO 100	Firma Zeiss, Oberkochen
Anregungslichtquelle (100 Watt Quecksilberdampf Lampe)	Firma Zeiss, Oberkochen
Objektive:	Firma Zeiss, Oberkochen
Plan-Neofluar, 100 x / 1,30 Oil	
Plan-Neofluar, 40 x / 0,75	
Filter (DAPI/Green/Orange Dreifachbandpass)	Firma Zeiss, Oberkochen
Immersionsöl	Firma Merck, Darmstadt

### 3.2.5. Zusätzliche Laborutensilien

Vorgereinigte, positivgeladene Glasobjektträger (Firma Menzel, Glaser); Objektträger „Superfrost Plus“ (Firma Menzel, Glaser); Deckgläser, 22 mm x 22 mm (Firma Menzel, Glaser); Mikroliterpipette und sterile Pipettenspitzen; Messpipetten; Zentrifugenröhrchen; Messzylinder; Pinzette; Kurzzeitwecker; Glasflaschen; Coplin – Färbetroge; Geeichtes Thermometer; Objektträgerbox; Wasserbadkammer; Handschuhe; Küvetten mit Deckel; Fixogum (Firma Marabu, Tamm); Eukitt (Firma Merck, Darmstadt); Aquatex (Firma Merck, Darmstadt).

### **3.3. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung ist eine Methode zum Nachweis von DNA-Sequenzen mit Hilfe einer DNA-Sequenz mit bekannter Struktur (Sonde), die komplementär der gesuchten Sequenz ist, und an der ein Fluoreszenzstoff gebunden ist. In diesem Fall wurde die Amplifikationsrate des HER-2/neu-Gens in den Ovarialkarzinomzellen mittels PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit bestimmt.

#### **3.3.1. Probeverarbeitung und Herstellung der Präparate**

##### **3.3.1.1. Probenentnahme und Verarbeitung**

Es werden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben aus Ovarialkarzinomgeweben verwendet.

Die Ovarialgewebeproben werden mit einer Dicke von 4 bis 6 Mikrometer mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten. Die Abschnitte werden in ein proteinfreies Wasserbad von 40°C überführt und anschließend auf der positiven Seite eines Organosilan-beschichteten Objektträgers aufgebracht, um ein Ablösen des Gewebes vom Objektträger während des FISH-Assays zu verhindern. Nach Lufttrocknen der Präparate werden diese über Nacht bei 56°C gebacken.

Um die Targetflächen zu identifizieren, wird eine H & E-Färbung an jedem 10. Präparat desselben Gewebeblocks durchgeführt.

##### **3.3.1.2. Vorbereitung der Präparate**

###### **3.3.1.2a. Prinzip**

Die Präparate müssen vollständig von Paraffin befreit und die Proben vor dem FISH-Assay fixiert werden.

Damit die Hybridisierung stattfinden kann, muß zuerst die Ziel-DNA, die im Präparat erkannt werden soll, als Einzelstrang vorliegen. Dies wird durch Hitzedenaturierung (bei 80° C) erreicht.

Für die Packungsdichte des Chromatins sind chromosomale Proteine verantwortlich. Ihr Abbau führt zu einer Verbesserung der Zugänglichkeit für die Ziel-DNA,

um bei der Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) stärkere Signale zu erhalten. Die Proteine werden deshalb enzymatisch mit der Protease Pepsin hydrolysiert.

### 3.3.1.2b. Materialien und Vorbereitung der Lösungen

Paraffin Vorbehandlungs-Reagens-Kit	Vorbehandlungslösung (NaSCN), 5x50ml Protease (Pepsin 2500-3000 u/mg), 5x25mg Protease Buffer (NaCl-Lösung, pH 2) Waschlösung (2xSSC, pH 7), 2 x 250ml
PathVysion™ HER-2 DNA Sonden – Kit ( LSI® HER-2/neu Spectrum Orange™ / CEP® 17 Spectrum Green™) <u>Davon wird benutzt:</u>	
4) 20 x SSC Salz	3M Natriumchlorid 0,3M Natriumcitrat
2 x SSC (zusätzliche Waschlösung)	20 x SSC - Lösung : Aqua dest. = 1:10; pH 7
20 x SSC-Lösung (für 500ml Lösung, pH 5.3)	- 132g 20xSSC in 400ml A.dest steril lösen - den pH - Wert bei Raumtemperatur mit HCl conc. auf pH 5.3 einstellen und die Lösung auf 500ml mit A.dest steril auffüllen - die Lösung sollte filtriert werden (0,45µl Pore) - bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar

Xylol, 100% EtOH, 0,2N HCl, Aqua dest. steril, 10% gepuffertes Formalin/4% Formaldehyd.

### 3.3.1.2c. Durchführung:

- Die Präparate werden 60 bis 120 Minuten bei 55 °C im Brutschrank in 45 °C Stellung gelegt.

- Deparaffinisierung der Präparate:

- Die Präparate bei Raumtemperatur 10 Minuten in Xylol tauchen.
- Zweimal wiederholen, dabei jeweils neues Xylol verwenden.
- Die Präparate bei Raumtemperatur 5 Minuten lang in 100% EtOH dehydrieren. Wiederholen.
- Präparate in den leicht geöffneten Brutschrank legen bis optisch trocken.

- Vorbehandlung der Präparate:

- Die Präparate 20 Minuten lang in 0,2N HCl tauchen.
- Die Präparate 3 Minuten lang in destilliertes Wasser tauchen.
- Die Präparate 3 Minuten lang in den Waschpuffer (2xSSC pH7) tauchen.
- Die Präparate 30 Minuten lang in die auf 80 °C erhitzte Vorbehandlungslösung tauchen.
- Die Präparate 1 Minute lang in ionisiertes Wasser tauchen.
- Die Präparate 5 Minuten lang in den Waschpuffer tauchen. Wiederholen.

- Protease- Behandlung:

- Überschüssige Pufferflüssigkeit entfernen, indem die Kanten des Objektträgers mit einem Papiertuch abgetupft werden.
- Die Präparate 100 Minuten lang in die auf 37 °C erhitzte Protease-Lösung tauchen (eventuell mit DAPI kontrollieren).
- Die Präparate 5 Minuten lang in den Waschpuffer tauchen. Wiederholen.
- Objektträger bei Raumtemperatur lassen bis sie optisch trocken sind.

- Fixierung der Präparate:

- Die Präparate bei Raumtemperatur 10 Minuten lang in 10%-iges gepuffertes Formalin/45%-iges Formaldehyd tauchen.
- Die Präparate 5 Minuten lang in den Waschpuffer tauchen. Wiederholen.
- Objektträger in den Wärmeschrank legen, bis sie optisch trocken sind.

### 3.3.2. Assay - Verfahren

#### 3.3.2.1. Hybridisierung

##### 3.3.2.1a. Prinzip

Unter Hybridisierung versteht man die Anlagerung einer spezifischen markierten DNA-Sonde an ihre charakteristische, auf einen Objektträger oder Filter immobilisierte, komplementäre DNA-Sequenz. Die LSI HER-2/neu DNA Sonde ist eine 190 kb große, mit SpectrumOrange direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für den Genlocus HER-2/neu (17q11.2-q12). Die CEP 17 DNA-Sonde ist eine mit 5,4 kb SpectrumGreen direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für die alpha-Satellit-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1). So wird der, die gesuchte Sequenz tragende DNA– Abschnitt mittels Fluoreszenzfarbstoff unter Mikroskop sichtbar gemacht.

##### 3.3.2.1b. Material und Vorbereitung der Lösungen

PathVysion™ HER-2 DNA Sonden – Kit  
( LSI® HER-2/neu Spectrum Orange™ /  
CEP® 17 Spectrum Green™)

##### Davon wird benutzt:

LSI HER-2/neu SpektrumOrange  
(low copy number E. coli Vector) /  
CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde  
(E. coli Plasmid)

SpectrumGreen Fluorophor- markierte  
alpha-Satellit-DNA-Sonde für Chromosom  
17, SpektrumOrange Fluorophor- markierte  
DNA- Sonde für den Genlokus von HER-  
2/neu, blockierende DNA, vordenaturiert in  
Hybridisierungspuffer.  
200µl/ 500µl/ 2x500µl

#### 3.3.2.1c. Durchführung (möglichst im Dunkeln)

- 10µl der Sondenmischung (oder mehr bei Präparatfläche größer als 22mm x 22mm) auf die Targetfläche des Objektträgers aufbringen. Sofort mit einem Deckglas abdecken, so daß die Sondenlösung sich gleichmäßig unter dem Deckglas ausbreitet. Luftblasen müssen vermieden werden, da sie die Hybridisierung verhindern. Übriggebliebene Sondenlösung sollte sofort nach Anwendung wieder eingefroren werden.
- Das Deckglas mit Fixogum wie nachstehend angegeben abdichten: Eine kleine Menge herausdrücken und um den Rand des Deckglases so applizieren, dass der Fixogum sowohl den Deckglasrand als auch den umliegenden Bereich des Objektträgers überdeckt und somit das Deckglas abdichtet.
- Die Objektträger in die auf 37°C vorgewärmte Hybridisierungskammer setzen. Die Kammer mit einem festem Deckel verschließen und über Nacht bei 37°C inkubieren (17 - 20 Stunden).

#### 3.3.2.2. Waschvorgang nach Hybridisierung

##### 3.3.2.2a. Prinzip

Die Bedingungen für die Hybridisierung werden meist so gewählt, dass nicht nur vollkommen komplementäre DNA-Fragmente miteinander hybridisieren können, sondern auch ein gewisses Maß an Fehlpaarungen (mismatch) zugelassen wird. Um bei der späteren Detektion nur Sonden-DNA nachzuweisen, die eine bestimmte Homologie zur Ziel-DNA aufweist, müssen Fragmente der Sonden-DNA, die an anderen Sequenzen als der Ziel-Sequenz mit geringerer Homologie hybridisiert haben, entfernt werden. Dies wird durch Spülen in einer Waschlösung erreicht, in der nur Hybride mit der gewünschten Homologie stabil bleiben, und alle anderen abgewaschen werden. Am Ende werden die Präparate mit DAPI – Gegenfärbung behandelt, damit die Zellen und die Zellkerne besser unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sind.

### 3.3.2.2b. Material und Vorbereitung der Lösungen

PathVysion™ HER-2 DNA Sonden – Kit  
( LSI® HER-2/neu Spectrum Orange™ /  
CEP® 17 Spectrum Green™)

#### Davon wird benutzt:

DAPI Gegenfärbung	1000 ng/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenyl-indol) in Phenylendiamin Dihydrochlorid, Glycerin und Puffer 300µl / 600µl / 1000µl
NP-40	NP-40 (4ml)
20 x SSC Salz	3M Natriumchlorid 0,3M Natriumcitrat
2 x SSC / 0,3% NP-40 – Lösung	- 100 ml 20x SSC mit 850 ml A.dest. steril mischen - 3,0 ml NP-40 zugeben - den pH-Wert bei Raumtemperatur auf 7,0-7,5 mit NaOH einstellen - mit A.dest steril auf 1 Liter auffüllen - bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar

### 3.3.2.2c. Durchführung (möglichst im Dunkeln)

- Nach der Hybridisierung einen Waschpuffer (2xSSC/NP- 40) in einen Coplin-Färbetrog geben. Den Waschpuffer aufwärmen, indem der Coplin-Färbetrog mindestens 30 Minuten in das 72±1 °C warme Wasserbad gestellt wird oder bis die Lösungstemperatur 72±1 °C erreicht hat.
- In einen zweiten Coplin-Färbetrog wird Waschlösung gegeben und dieser wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Beide Waschlösungen nach einem Tag Benutzung verwerfen.

- Entfernen des Fixogums vom ersten Objektträger, indem man vorsichtig mit der Pinzette an der Dichtung zieht.
- Den Objektträger bei Raumtemperatur in die Waschlösung tauchen und das Deckglas abschwimmen lassen.
- Nachdem das Deckglas vorsichtig entfernt wurde, wird die übermäßige Flüssigkeit entfernt, indem die Kante des Objektträgers vorsichtig abgetupft wird. Den Objektträger 3 Minuten lang in die auf  $72\pm 1$  °C erhitzte Waschlösung tauchen (=6 Objektträger/Trog).
- Die einzelnen Objektträger aus dem Waschbad entfernen und aufrecht stehen lassen. Im Dunkeln an der Luft trocknen. (Eine geschlossene Schublade oder ein Fach in einem geschlossenen Schrank reichen hierzu aus.)
- Ca. 10µl DAPI II – Gegenfärbung auf jeden zu untersuchenden Bereich des Objektträgers pipettieren und ein Deckglas auflegen. Das/die Präparat(e) bis zum Auszählen der Signale im Dunkeln aufbewahren.

#### 3.3.2.3. Aufbewahrung der Präparate

Hybridisierte Objektträger (mit Deckglas) bei -20 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach der Entnahme aus der -20 °C kühlen Aufbewahrung die Objektträger auf Raumtemperatur erwärmen lassen, bevor die Beobachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop begonnen wird.

#### 3.3.2.4. Auszählung der Sondensignale

3.3.2.4a. Sicherstellen, dass das mikroskopische Präparat von ausreichender Qualität ist.

Dazu werden folgende Kriterien herangezogen:

- Sondensignalintensität: Das Signal sollte hell, eindeutig und leicht zu beurteilen sein. Die Signale sollten entweder hell, kompakt und von ovaler Form oder faserig, diffus und von ovaler Form sein.
- Hintergrund: Der Hintergrund sollte dunkel oder schwarz erscheinen und relativ frei von fluoreszierenden Partikeln oder Schleiern sein.



### 3.3.2.4b. Auszählung der Fluoreszenzsignale

#### Prinzip

Die Lage der gesuchten DNA-Sequenz im Präparat kann sichtbar gemacht werden, indem man es mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dieses muss allerdings mit einem speziellen Anregungsfilter ausgestattet sein, der der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes entspricht.

Am Mikroskop, unter Benutzung des DAPI/Green/Orange-Dreifachbandpass-Filtersatzes, erscheinen die Fluoreszenzsignale wie folgt:

Zellen – blau, Zentromere (CEP 17) – grün; markierte HER-2/neu-DNA-Areale – rot.

Es werden 30 morphologisch intakte Tumorzellkerne (sie sind in der Regel länger als die Kerne von gesunden Zellen, Lymphozyten und epithelialen Zellen) in der Interphase gezählt. Zellkerne ohne Signal oder mit Signalen von nur einer Farbe werden von der Auswertung ausgeschlossen. Ausgewertet werden nur die Zellen, die mindestens ein deutliches HER-2/neu- und ein deutliches CEP 17-Signal in gut erkennbaren Zellkerngrenzen aufweisen. Die HER-2/neu- und die CEP 17-Signale werden in den einzelnen Zellen gezählt und in einer Tabelle dokumentiert. Jedes Präparat hat seine eigene Tabelle (s. Tabelle 6).

#### Durchführung

Das Mikroskopieren wird im Dunkeln, mit Hilfe einer Quecksilberlampe durchgeführt, damit die Fluoreszenzsignale besser zu sehen sind und nicht vom Tageslicht abgeschwächt werden. Präparate, die aus dem Gefrierfach (-20 °C) genommen werden, sollten zuerst für einige Minuten bei Raumtemperatur belassen werden.

- Vorgeschriebenes Filter einsetzen.
- Ein 25fach vergrößerndes Objektiv verwenden, um das Hybridisierungsareal zu beobachten, und Lokalisieren der relevanten Targetzellen. Vermeiden von Flächen mit Nekrose und solchen, in denen die Grenzen individueller Zellkerne nicht klar erkennbar sind.
- Mit einem Objektiv mit 40facher Vergrößerung sollten mehrere Flächen mit Tumorzellen gescannt werden, um eine mögliche Heterogenität feststellen zu können. Auswählen einer Fläche mit einer guten Zellkernverteilung. Vermeiden von Flächen, in denen nur schwache Hybridisierungssignale vorhanden sind.

- Verwenden von Ölimmersionsobjektiv (100fache Vergrößerung), um die Analyse im selektierten Bereich durchzuführen. Beginn der Analyse: im linken oberen Teil dieses Bereichs und weitere Durchmusterung von links nach rechts.
- Zählen der Signale:
  - Zählen von Zellkernen, die zwei grüne Signale und mindestens zwei orange Signale haben, die klar zu erkennen sind;
  - Zählen von zwei Signalen mit gleicher Größe, deren Abstand voneinander kleiner oder gleich groß ist wie der Durchmesser eines der Einzelsignale, als ein Signal;
  - Zählen keiner Zellkerne, von denen kein Signal oder aber Signale von nur einer Farbe ausgehen;
  - Ignorieren von Zellkernen mit Signalen, die ein subjektives Urteil erfordern.
  - Überspringen von Signalen mit geringer Intensität, ohne ausgeprägte Spezifität oder mit hohem Hintergrund;
  - Überspringen von Zellkernen, deren Gegenfärbung nicht ausreicht, um die Grenze des Zellkerns festzustellen;
- Notieren der Auszählung in einer Tabelle:

HER2neu (orange)	CEP (grün)	DAPI
01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	Ja/Nein
01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	Ja/Nein
01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	Ja/Nein
01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	Ja/Nein

**Tabelle 6.** Tabelle zur Notierung der Signalausählung

### 3.3.2.5. Interpretation der Ergebnisse

Die Anzahl der LSI HER-2/neu und CEP 17 Signale (Zentromere) pro Zellkern wurde in einer Tabelle notiert. Das Ergebnis bei der Auszählung von 30 Interphasen-Zellkernen aus Tumorzellen pro Präparat wurde als das durchschnittliche Verhältnis der HER-2/neu Anzahl zu der von CEP 17 beschrieben. Die Ermittlung der Her-2/neu: CEP 17 – Ratio ist notwendig um eine tatsächliche Genamplifikation von einer vermehrten Her-2/neu Signalzahl aufgrund einer erhöhten Zahl des Chromosoms 17 (Polyploidie des Chromosoms 17) unterscheiden zu können. Die Auswertung erfolgte gemäß den Vorgaben im Protokoll des Sonden – Kits der Firma Vysis. Eine Genamplifikation lag bei einer Signalratio LSI HER-2/neu: CEP 17  $\geq 2.0$  vor (Abbildung 5). Proben ohne Amplifikation zeigten ein Verhältnis von  $\leq 2.0$  (Abbildung 6).

Ergebnisse, die beim oder nahe am Grenzwert (1.8 – 2.2) lagen, sind mit Vorsicht zu interpretieren.

## 3.4. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, die spezifische Proteine durch Bindung von Antikörpern nachweist. Diese Primärantikörper werden wiederum durch Farbstoff- oder Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Die Immunhistochemie wird vor allem für folgende diagnostische Fragestellungen eingesetzt: Differentialtypisierung maligner Neoplasien (Primärtumor und Metastasen; Unterscheidung solide vs. hämatologische Neoplasien), Bestimmung von Prognose- und Prädiktionsfaktoren (z.B. Mammakarzinom - Steroidrezeptoren, HER-2/neu; Non Hodgkin-Lymphome - p53).

Diagnostische Schwerpunkte liegen bei den Neuroendokrinen Tumoren, Lymphomdiagnostik und Gynäkopathologie. Hierbei werden ergänzend auch molekularpathologische Techniken, wie die RNA- und DNA In-situ Hybridisierung eingesetzt.

Deshalb wurde hier die immunhistochemische Methode mit ABC-Komplex zum Nachweis des HER-2/neu Genproduktes benutzt.

### **3.4.1. Schneiden der in Paraffin eingebetteten Präparate und Fixieren der Schnitte auf Objektträger**

Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms werden 2-3µm dicke Gewebsschnitte vom Block heruntergeschnitten und auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger („Superfrost Plus“) aufgezogen. Zum besseren Anhaften empfiehlt es sich, zusätzlich zu der Beschichtung die Schnitte über Nacht bei ca. 56-58°C im Brutschrank aufzutrocknen. Man sollte mit der Temperatur nie über 60°C gehen, da sonst Antigenstrukturen zerstört werden können.

### **3.4.2. Vorbehandlung der Präparate**

#### **3.4.2.1. Trocknen und Entparaffinieren**

##### **3.4.2.1a. Prinzip**

Das Trocknen sollte über ausreichend lange Zeit durchgeführt werden. Wasserrückstände unter dem Schnitt können zur Zerstörung des Präparates während der Hitzedemaskierung führen.

Das Paraffin sollte vollständig aus dem Gewebe herausgelöst werden. Verbleibende Paraffinreste im Gewebe führen dazu, dass der Primärantikörper an diesen Stellen das Antigen nicht erkennen kann. Es kommt zu scheckigen, schachbrettartigen Färbeergebnissen.

##### **3.4.2.1b. Material und Vorbereitung der Lösungen**

Xylol; 100% iger, 96% iger, 70% iger Alkohol, Aqua dest.

##### **3.4.2.1c. Durchführung**

- Trocknen der Präparate bei 37 °C-58 °C über Nacht
- Entparaffinisieren 2 x 5 Minuten in Xylol
- Dehydrieren in 2x 100% igem + 2x96% igem + 2x 70% igem Alkohol
- Mit Aqua dest. spülen

### 3.4.2.2. Hitzeinduzierte Demaskierung

#### 3.4.2.2a. Prinzip

Zur Darstellung mancher Antigene ist eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung unumgänglich. Die durch die Formalinfixierung verursachte Proteinvernetzung wird durch Erhitzen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Na-Citratpuffer, pH 6.0) wieder aufgehoben. So kann der Antikörper sein spezifisches Epitop wiedererkennen.

#### 3.4.2.2b. Material und Vorbereitung der Lösungen

Na-Citratpuffer 10 mM	Lösung A: 21,01g 0,1m Zitronensäure ( $C_6H_8O_7H_2O$ ) + 1l Aqua dest. Lösung B: 29,41g 0,1m Na-Citrat ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) + 1l Aqua dest. <u>Gebrauchslösung:</u> 18ml Lösung A + 82ml Lösung B + 900ml A. dest
PBS	10mM Natriumphosphat 0,9%-Salzlösung, pH 7.5

#### 3.4.2.2c. Durchführung

- In einen handelsüblichen Schnellkochtopf wird 1 Liter Citrat–Puffer eingefüllt und die Kochplatte auf die höchste Stufe eingestellt.
- Wenn der Puffer sprudelnd kocht, werden die Schnitte hineingestellt und der Deckel schnell geschlossen.
- Zeigt die Druckanzeige den zweiten weißen Ring (oder andere Markierung für höchsten Druck) an, lässt man die Präparate für 4 Minuten inkubieren.
- Anschließend nimmt man den Kochtopf von der Kochplatte, stellt ihn unter fließend kaltes Wasser und lässt den Druck entweichen.
- Danach öffnet man den Deckel und lässt langsam kaltes Leitungswasser zur Abkühlung zulaufen.

- Die Schnitte können dann herausgenommen werden.
- Schnitte in Leitungswasser abkühlen lassen.
- Schnitte mit Aqua dest. spülen.
- Schnitte 2 x 2 Minuten mit PBS spülen.

#### 3.4.2.3. Blockierung der endogenen Peroxidase

##### 3.4.2.3a. Prinzip

Trotz der Fixierung und Einbettung des Untersuchungsmaterials wird die endogene Enzymaktivität im Gewebe nicht völlig zerstört. Daher sind für immunhistochemische Nachweise Blockierungen der endogenen Enzyme notwendig, um deren Mitreaktion und damit falsch positive Ergebnisse zu verhindern.

Zu einer Farbreaktion kommt es, indem das Enzym Peroxidase mit dem Substratpuffer  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen ein farbiges Endprodukt bildet, welches sowohl löslich als auch unlöslich in organischen Lösungsmitteln enthalten sein kann. Die Substrat-Chromogen-Reaktion kann nicht unterscheiden, ob die Peroxidase endogen (hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten), also im Gewebe lokalisiert ist, oder ob sie nachträglich zugegeben wurde (ABC-System mit Peroxidase).

##### 3.4.2.3b. Material und Vorbereitung der Lösungen

6% $\text{H}_2\text{O}_2$	100 ml 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ 400 ml Aqua dest.
PBS	10mM Natriumphosphat 0,9%- Salzlösung, pH 7.5

##### 3.4.2.3c. Durchführung

- Das einfachste Mittel zur Eliminierung der endogenen Peroxidase ist eine Inkubation des Präparates mit Wasserstoffperoxid (6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  für ca. 10 Minuten).
- Die Schnitte anschließend 2x2 Minuten mit PBS spülen.

#### 3.4.2.4. Blockieren mit Normalserum

##### 3.4.2.4a. Prinzip

Das „Normalserum“ dient in der Immunhistochemie zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut und damit zur Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen. Dieses Serum besitzt also keine spezifischen Antikörper gegen die gesuchten Antigene und blockiert somit die unspezifischen Bindungsstellen. Die Auswahl der richtigen Tierspezies des Normalserums richtet sich nach der Tierspezies des verwendeten Sekundär- oder Brückenantikörpers.

##### 3.4.2.4b. Material und Vorbereitung der Lösungen

Vectastain® ABC Kit

Davon wird benutzt:

Blockierungsserum (Normalserum)

Verdünnung:

3 Tropfen Normalserum

10ml PBS steril

##### 3.4.2.4c. Durchführung

Die Schnitte werden mit dem Normalserum für mindestens 20 Minuten in einer Wasserbadkammer inkubiert. Wichtig dabei ist, das Normalserum vom Schnitt nach der Inkubation nur ablaufen zu lassen. Auf keinen Fall darf das Präparat abgespült werden, da sonst der Ausgangszustand des Präparates wiederhergestellt wäre.

#### **3.4.3. Ansetzen der Primärantikörper**

##### 3.4.3.1. Prinzip

Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das gewünschte Antigen gerichtet. Er muss so hoch wie möglich verdünnt werden, um Hintergrundfärbungen aufgrund zu

hoher Proteinkonzentration zu vermeiden. Hier wurden Polyklonale Antikörper benutzt (Antikörper, die mehrere antigene Determinanten erkennen).

#### 3.4.3.2. Material und Vorbereitung der Lösungen

Polyclonal Rabbit Anti-Human  
c-erbB-2 Oncoprotein

Verdünnung:

Primärantikörper : PBS steril = 1: 250

#### 3.4.3.3. Durchführung

- Die Schnitte werden mit dem verdünnten Primärantikörpermedium für 30-60 Minuten in einer Wasserbadkammer inkubiert.
- Die Schnitte anschließend 2x2 Minuten mit PBS spülen.

### 3.4.4. Ansetzen der Sekundärantikörper

#### 3.4.4.1. Prinzip

Der Sekundärantikörper bildet eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex. Der Sekundärantikörper bindet mit seinem Fab-Fragment am Fc-Fragment des Primärantikörpers.

Der Sekundärantikörper wird im Überschuß zur Reaktion zugegeben. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß nur ein Fab-Stück des Sekundärantikörpers bindet und das andere Fab-Stück für den Komplex frei bleibt.

#### 3.4.4.2. Material und Vorbereitung der Lösungen

Vectastain® ABC Kit

Davon wird benutzt:

Normalserum

Anti-Kaninchen IgG Biotinylierte

Brückenantikörper

Verdünnung:

Normalserum

3 Tropfen Normalserum

1 Tropfen Brückenantikörper

10 ml PBS steril



#### 3.4.4.3. Durchführung

- Die Schnitte werden mit dem verdünnten Sekundärantikörpermedium für 30 Minuten in einer Wasserbadkammer inkubiert.
- Die Schnitte anschließend 2x2 Minuten mit PBS spülen.

#### 3.4.5. Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex)

##### 3.4.5.1. Prinzip

Die ABC-Methode macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Der immunologische Nachweis mit dieser Methode ist sehr sensitiv.

Für die ABC-Methode verwendet man einen Brückenantikörper, welcher mit Biotin markiert (biotiniert) ist. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an den Brückenantikörper koppeln lässt und somit die Verbindung zum ABC - Komplex herstellt.

Der Komplex wird so produziert, daß an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird. An den Komplex ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Das Enzym Peroxidase bildet mit dem Substratpuffer,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10mM Natriumphosphat 0,9%-Salzlösung, pH 7.5 als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen (hier DAB), ein farbiges Endprodukt (hier braun).

##### 3.4.5.2. Material und Vorbereitung der Lösungen

Vectastain® ABC Kit

Davon wird benutzt:

ABC-Reagenz A und B

Verdünnung:

(30 Minuten vor Gebrauch ansetzen)

4 Tropfen ABC-Reagenz A

4 Tropfen ABC-Reagenz B

10 ml PBS steril

##### 3.4.5.3. Durchführung.

- Die Schnitte werden mit dem verdünnten ABC-Komplex für 30 Minuten in einer Wasserbadkammer inkubiert.
- Die Schnitte anschließend 2x2 Minuten mit PBS spülen.

### **3.4.6. Substratfärbung mit dem Chromogen DAB (3,3 Diaminobenzidin) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer**

#### **3.4.6.1. Prinzip**

Das Enzym Peroxidase bildet mit dem Substratpuffer,  $H_2O_2$ , als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen, hier DAB, ein farbiges Endprodukt (hier braun).

Die Gegenfärbung erfolgt mit saurem Hämalan nach Mayer. Dabei handelt es sich um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung, dessen pH-Wert bei ca. 4,5 liegt. Bei diesem pH-Wert werden nur die Kerne gefärbt, da nur sie eine negative Ladung haben. Dabei lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffe an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Kern an. Das Auswaschen der Säurereste und das Blaufärben erfolgt in Leitungswasser in alkalischem Milieu.

#### **3.4.6.2. Material und Vorbereitung der Lösungen**

Das Röhrchen, in dem der Puffer vorbereitet wird, sollte wegen der Lichtempfindlichkeit des Chromogens in einer Alu-Folie eingewickelt sein.

DAB (3,3-Diaminobenzidin) Substrat Kit	<u>Ansetzen:</u>
	5 Tropfen Puffer Konzentrat DAB
	2 Tropfen 3% Hydrogen Peroxidase
	5 Tropfen DAB Chromogen
	5 ml Aqua dest.

Hämatoxilin nach Mayer

Xylol; 100% iger, 96% iger, 70% iger Alkohol, Aqua dest., Eukitt

#### **3.4.6.3. Durchführung (möglichst im Dunkeln)**

- Die Schnitte werden mit dem DAB Puffer für 2 - 10 Minuten in einer Wasserbadkammer inkubiert.
- Die Schnitte anschließend 2x2 Minuten mit Aqua dest. spülen.
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für ca. 2 Minuten.
- Die Schnitte mit Leitungswasser wässern.

- Die Schnitte werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und absolutem Ethanol entwässert.
- Danach erfolgt die Aufhellung in Xylol.
- Eindecken der Schnitte mit Eukitt.

### 3.4.7. Interpretation der Ergebnisse

Die Expressionsrate des HER-2/neu Onkoprotein, die Intensität und das Muster der Membrananfärbung wurde von einem erfahrenen Pathologen, entsprechend der vom Hersteller (DAKO) vorgeschlagenen Kriterien, bestimmt (siehe Tabelle 7).

Membranfärbung	Auswertungsscore
keine Membranfärbung oder < 10% der Tumorzellen mit einer membranständigen Anfärbung	0 oder negativ
partielle oder unvollständige schwache Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen	1+ oder negativ
schwache bis mäßige, aber vollständige Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen	2+ oder schwach positiv
starke und vollständige Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen	3+ oder stark positiv

**Tabelle 7.** Auswertung der Expressionsrate von HER-2/neu Onkoprotein nach immunhistochemischer Membranfärbung.

Tumorzellen mit vollständiger Membrananfärbung (mit einem Auswertungsscore von 2+ und 3+) wurden als positiv gewertet.

Die zytoplasmatischen Anfärbungen wurden als nicht spezifisch erachtet und in der Analyse der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

### **3.5. Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Knochenmark**

#### **3.5.1. Durchführung der Knochenmarkaspirationen**

An der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der LMU München wird die Knochenmarkspunktion im Bereich der Spina iliaca anterior superior bei Patientinnen mit Verdacht auf ein Mamma-, Ovarial- oder Zervixkarzinom nach Durchführung der Intubationsnarkose, aber vor Beginn der Primäroperation durchgeführt. Zum Zweck einer Verlaufskontrolle nach erfolgter Primärtherapie oder im Rahmen der onkologischen Nachsorge wird der Eingriff in Lokalanästhesie ambulant auf der tagesklinischen Station der Klinik vorgenommen. Durch eine kleine Schnittein-zision der Haut am Punktionsort wird das Risiko für eine Kontamination des Präparates mit epithelialen Hautzellen reduziert.

Das Knochenmark wird in mit 0,5 – 1 ml Natrium-Heparin versetzte Spritzen gewonnen und anschließend unmittelbar in das tumorimmunologische Labor gebracht, um dort aufgearbeitet zu werden.

Das schriftliche Einverständnis zum Eingriff und zur wissenschaftlichen Auswertung der aus dem Material gewonnenen Erkenntnisse wird von allen Patientinnen vor der Knochenmarkpunktion eingeholt. Zur Risikoaufklärung gehört neben den generell gültigen Risiken, wie Blutung, Infektion und Wundheilungsstörung, auch das aufgrund der Punktionsstelle erhöhte Verletzungsrisiko der Beckengefäße (Aa. und Vv. iliaca communis, iliaca interna et iliaca externa), sowie das seltene und schwerwiegende Ereignis einer Osteomyelitis. An der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der LMU München ist bei über 2800 Punktionen bislang noch keine klinisch relevante Komplikation aufgetreten. Die Patientinnen beschreiben immer wieder vorübergehende Reizungen des Periostes, sowie kleinere kutane Hämatome, ohne dass es jedoch hierdurch zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Patientinnen gekommen wäre.

#### **3.5.2. Aufbereitung des Knochenmarkaspirates und Detektion Zytokeratin-positiver Zellen**

Die im Folgenden beschriebene Aufarbeitung des Knochenmarkes und die Detektion von Zytokeratin-positiven Zellen erfolgte weitgehend nach dem von Pantel

et al. 1994 eingeführten Protokoll [206]. Zwei grundlegende Arbeitsschritte sind hierzu nötig:

#### 3.5.2.1. Das Anfertigen knochenmarkszelltragender Zytospins

Zur Herstellung der Zytospins wird das Knochenmark zunächst unter sterilen Bedingungen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Hankscher Lösung (Biocrom, Berlin) auf 50ml aufgefüllt und 10 min bei 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei  $r = 16$  (entsprechend 160g) in einer Hettich Zentrifuge Universal 30F bei einer Temperatur von 21 °C zentrifugiert (Auslauf ungebremst). Plasma, Fettpartikel und Detritus können hierdurch aus der Probe entfernt werden. Der obere Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Die Zellsuspension (Pellet) wurde anschließend in ein 15ml Zentrifugenröhrchen mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Dichte 1,077 g/ml) überdeckt.

Es folgt die Dichtegradientenzentrifugation bei 900g (2300 rpm, 21 °C) über 30 Minuten (Auslauf ungebremst). Tumorzellen, Knochenmarkzellen und eine leukozytäre Fraktion werden durch diesen Vorgang aus der peripheren Blutbeimengung in der Interphase angereichert. Erythrozyten und Granulozyten gelangen weitestgehend in das Pellet. Die leukozytäre Fraktion ist als „Ring“ zu erkennen.

Die Interphase und die obere Phase werden mit einer Pipette aufgenommen, in ein neues 50ml Röhrchen überführt, und mit Phosphatpuffer (PBS, pH = 7,4) auf 50 ml aufgefüllt. Über eine Zeit von 10 min bei rpm 1600 und 4° Celsius (Auslauf gebremst) folgt eine neue Zentrifugierung. Nachdem der Überstand verworfen wird, wird das Sediment in PBS gewaschen und auf 2-3ml resuspendiert. Mit der Pipette wird das Gesamtvolumen der Suspension bestimmt. Im Anschluss wird eine volumengleiche Mischung von 10 µl der eben bereiteten Suspension mit 10 µl Trypanblau hergestellt. Durch diese Farbsuspension wurde sowohl eine mikroskopische Vitalitätsprüfung der Zellen, als auch die Bestimmung der Zelldichte ermöglicht. Bei einem angesetzten Sollwert von 50-300 Zellen/Quadrat erfolgt die Auszählung der Zellen in der Neubauer Zählkammer (Thomakreuz 25 Quadrate ausgezählt). Der notwendige Anteil vom Aspirationsvolumen zur Herstellung des Zytospins läßt sich mit folgender

Formel berechnen: 
$$\text{Volumen} = \frac{10^6 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Hierdurch ist gewährleistet, dass die geschätzte Zellzahl von  $10^6$  Zellen pro Zytospin erreicht wird. Das Volumen wird in eine 15ml Zentrifugations-Tube überführt und mit PBS auf 4ml aufgefüllt. Nach Fertigstellung der Träger erfolgte die Zentrifugation über 3 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur auf einer Hettich Universal 30 F Zentrifuge (Auslauf gebremst). Die so angefertigten Zytospins werden nun 12 – 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

### 3.5.2.2. Die immunzytochemische Färbung der Zytospins

#### 3.5.2.2a. Material

Mouse monoclonal antibody A45-B/B3 APAAP, Mouse Monoclonal	Isotyp: IgG <sub>1</sub> Besteht aus löslichen Immunkomplexen aus intestinaler alkalischen Phosphatase vom Kalb und monoklonaler Maus-Anti-Alkalischer Phosphatase Isotyp: IgG <sub>1</sub> (Kappa)
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin, Z 0259	Isotyp: IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub> , IgG <sub>3</sub>

Substratlösung für APAAP-Färbung (besteht aus drei separat angesetzten Lösungen):

Lösung I	- 90mg Levamisole (L-2,3,5,6-Tetrahydro- 6-phenylimidazol 2,1-b thiazole) - 62,5 ml 0,2-molare Trislösung - 250 ml Aqua dest.
Lösung II	- 50 mg NaNO <sub>2</sub> - 1250 µl Aqua dest. - 500 µl 5% Neufuchsin (in 2-molarer HCL-Säure)
Lösung III	- 125 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat, gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid
Lösungen I und II mischen, dann Lösung III dazu geben. Die dadurch entstandene Lösung filtrieren.	

### 3.5.2.2b. Durchführung

Die immunzytochemische Färbung von mindestens vier Präparaten erfolgt mit dem monoklonalen Antikörper A45/B/B3 und der APAAP-Technik. Das Antikörperserum wird zunächst in PBS auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Applikation der Antikörper erfolgt über einen Zeitraum von 45 min. Der murine monoklonale Antikörper A45-B/3 erkennt ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 [138, 207, 208].

Es schließt sich ein dreifacher Waschvorgang mit PBS an und daraufhin die Inkubation über 30 min mit dem Rabbit-Mouse Brückenantikörper. Daraufhin folgt erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und Inkubation mit dem APAAP-System. Die Präparate verbleiben 20 min in der gefilterten Substratlösung. Die gewaschenen Präparate werden feucht mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex mit Deckgläschen bedeckt.

### 3.5.3. Interpretation der Ergebnisse

Durch manuelles Screening mittels Durchlichtmikroskopie können nun die angefärbten, cytokeratin positiven Zellen detektiert werden. Pro Patientin werden standardisiert 2 Objektträger entsprechend  $2 \times 10^6$  Zellen untersucht.

Alle der folgenden Kriterien für die Klassifikation einer isolierten Tumorzelle bei Positivfärbung müssen erfüllt sein:

- Nachgewiesene Zellintegrität bei der Vitalitätsprüfung der Zellen (durchgehende Zellmembran, Zellkern abgrenzbar)
- Zellen gleichmäßig angefärbt (darf intrazelluläre Granula haben)
- Im Phasenkontrast Bestätigung der Färbung und gut erkennbarer Zellkern
- Positivfärbung in gleicher Ebene mit den umgebenden Zellen
- Weitere pathomorphologische Kriterien wie etwa das Zellkern/Zellplasmaverhältnis wurden nicht angewandt.

Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle mit dem Antikörper A45B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik; zu beachten ist vor allem die fehlende Anfärbung der im Hintergrund erkennbaren Knochenmarkszellen.

Diese definierenden Kriterien gelten sowohl für singuläre isolierte Tumorzellen, als auch für sogenannte Zellcluster, also Konglomeraten von mindestens zwei cytokeratin-positiven Zellen. Alle Präparate werden grundsätzlich von zwei unabhängigen Mitarbeitern des Labors für Tumorimmunologie ohne Kenntnis der Tumorentität und des Tumorstadiums analysiert. Für die endgültige Klassifikation zu einer Tumorzelle müssen beide Gutachter übereinstimmen.

#### 3.5.4. Positiv und Negativ Kontrolle / Spezifitätskontrolle

Bei der immunzytochemischen Färbung der Zytospins wird eine standardisierte Spezifitätskontrolle mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollantikörper werden murine Immunoglobulin-Isotype aus Myelomen eingesetzt, die keine menschlichen Epitope erkennen (Klon MOPC 21, Isotype IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>). Analog zu den Patientenproben werden  $2 \times 10^6$  Zellen untersucht. Ein Lymphknotenpräparat wird als Negativkontrolle verwendet. Die verwendete Konzentration des MOPC-Antikörpers beträgt 1:500. Als Kontrollpräparate dienen Zelllinien mit definierter Antigenität. Dies erlaubt die sichere Interpretation spezifischer Bindungen verschiedener monoklonaler Antikörper auf bekannten, antigen-positiven Zelllinien und eventuell unspezifischer Bindungen auf bekannten, antigen-negativen Zelllinien. Auf diese Weise kann ein positives sowie ein negatives Färberesultat verifiziert werden.

### 3.6. Nachsorge

Die Nachsorge der Patientinnen erfolgte überwiegend in der onkologischen Ambulanz der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der Ludwig-Maximilian-Universität München. Um die Daten der Patientinnen mit externer onkologischer Nachsorge zu erheben, wurden in regelmäßigen Abständen die niedergelassenen Kollegen kontaktiert. Die Nachsorgetermine fanden in folgenden Zeitabständen statt: alle drei Monate in den ersten zwei Jahren nach Erst- oder Rezidivdiagnose, alle 6 Monate in den nächsten 3 Jahren und anschließend jährlich. Jede Nachsorgeuntersuchung bestand aus Nachsorgeanamnese, klinisch-gynäkologischer körperlicher Untersuchung, apparativer Diagnostik (vaginaler/ abdominaler Sonographie;



beschwerdeorientiert Röntgen-Thorax und CT), Bestimmung des Tumormarkers CA-125 im Serum.

Der Gesundheitszustand der Patientinnen wurde bis zu deren Austritt aus der onkologischen Nachsorge oder bis zu deren Tod beobachtet. Alle gemeldeten Todesfälle wurden durch Vergleich mit dem Tumorregister verifiziert [209].

### **3.7. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgt mit der Statistiksoftware 'Statistical Package for the Social Sciences 11.0' (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Berechnung der Überlebenskurven geschieht nach der Kaplan-Meier-Methode, deren Vergleich nach dem Log-Rank-Test. Die multivariate Analyse erfolgt nach dem Cox-Regressionsmodell [210, 211]. Die Signifikanzprüfung zwischen kategorialen Variablen wird mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt, der Vergleich von Mittelwerten kontinuierlicher Größen mit dem zweiseitigen T-Test. Korrelationskoeffizienten werden zweiseitig nach Pearson berechnet. Ein signifikanter Unterschied wird bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Patienten- und Tumorcharakteristika**

Es wurden Tumorparaffinblöcke von 89 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom, die an der Universitäts-Frauenklinik Maistraße im Zeitraum von 1994 bis 2001 operiert worden waren, untersucht (s. Tabelle 8). Vor der Primäroperation wurde bei jeder Patientin eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Alle Patientinnen mussten am Tag vor dem geplanten Eingriff ihr schriftliches Einverständnis zu diesen zusätzlichen Untersuchungen geben. Ausgeschlossen wurden Patientinnen, bei denen eine primäre Fernmetastasierung oder ein Zweitmalignom vorlag.

Das mittlere Lebensalter der Patientinnen bei der Erstdiagnose des Tumors war 60 Jahre (Minimum 28, Maximum 79), 78 Patientinnen (87,6%) waren postmenopausal und 11 (12,3%) prämenopausal.

Bei 64 Patientinnen (71,9%) wurde ein papillär- seröses Ovarialkarzinom, bei 11 Pat (12,3%) ein Adenokarzinom ohne weitere Histologieangaben, bei 6 (6,7%) ein endometroides Adenokarzinom, bei 3 (3,4%) ein Klarzellkarzinom, bei 2 (2,2%) ein muzinöses Adenokarzinom, bei 2 (2,2%) ein undifferenziertes Karzinom, bei 1 (1,1%) ein Karzinom vom Psammomkörperpertyp gefunden und für eine Patientin gab es keine Angaben zur Histologie des Tumors. Bei allen Patientinnen (ausschließlich der Patientin mit dem Karzinom vom Psammomkörperpertyp) wurde das FIGO- Stadium des Tumors wie folgt bestimmt:

8 (9%) hatten Stadium FIGO I, 7 (7,9%) FIGO II, 59 (66,3%) FIGO III, 14 (15,7%) FIGO IV. Das Grading der Ovarialkarzinome ergab, dass 14 Patientinnen (15,7%) einen Tumor G1, 25 (28,1%) einen Tumor G2 und 45 (50,6%) G3 aufwiesen. Bei 4 Patientinnen (4,5%) konnte der Differenzierungsgrad nicht beurteilt werden und von einer Patientin wurde er nicht bestimmt.

Die Größe der postoperativ verbliebenen Tumormassen war bei 62 Patientinnen bekannt. Davon war bei 38 (61,3%) ein mikroskopischer und bei 24 (38,7%) ein makroskopischer Tumorrest verblieben.

Eine Lymphangiosis karzinomatosa wurde bei 27 (30,3%), eine Peritonealkarzinose bei 74 (83,1%) und eine Hämangiose bei 10 (11,2%) aller Patientinnen gefunden. 53 (59,6%) der Patientinnen hatten Aszites.

Von 38 Patientinnen, deren Lymphknoten histologisch untersucht wurden, zeigten 23 (60,5%) einen Lymphknotenbefall. Die Zahl der entfernten Lymphknoten variierte zwischen 1 und 81, im Median waren 5 Lymphknoten befallen.

Die Primäroperation bestand bei 28 Patientinnen (31,4%) aus einem palliativen Tumordebulking, bei 17 (19,1%) wurde eine Hysterektomie, Adnexextirpation beidseits und Omentektomie, bei 16 (18,0%) zusätzlich eine regionale Lymphnodektomie und bei 28 (31,5%) eine andere Operation (z.B. Probenentnahmen bei ausgedehnter Tumormanifestation und einem inoperablen Situs, zusätzliche Darmteilresektion, Entfernung von peritonealen Tumorplatten) durchgeführt. Eine adjuvante systemische Chemotherapie erhielten 66 Patientinnen (74,2%) wie folgt: 49 (55,1%) Carboplatin und Cyclophosphamid, 8 (9%) Carboplatin und Paclitaxel, 3 (3,4%) Treosulfan und 6 (6,7%) andere Chemotherapeutika. 22 Patientinnen wurden nicht chemotherapiert und bei einer Patientin ist nicht bekannt, ob sie eine zytostatische Therapie erhielt. Eine adjuvante Radiatio erhielten 2 Patientinnen (2,2%), eine Patientin (1,1%) wurde palliativ bestrahlt, 85 (95,5%) bekamen keine Radiotherapie und bei einer Patientin gab es hierüber keine Angaben. Die primäre Therapieentscheidung wurde in Unkenntnis des Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Ratio getroffen.

#### **4.2. Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms**

Bei 19 von 89 Patientinnen (21,3%) ließen sich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms disseminierte Tumorzellen im Knochenmark feststellen. Diese 19 Pat hatten im Median 2 Zellen pro 2 Mio gescreenter Zellen.

Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorstadium, Grading, makroskopischer Tumorrest, Aszites, Peritonealkarzinose, Lymphangiose und Hämangiose (s. Tabelle 8). Jedoch korrelierte der Nodalstatus mit dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

Variable	Anzahl der Patientinnen		Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark		p**
	Gesamt*	Anteil	Anzahl	%	
Gesamtzahl der Patientinnen	89		19	21.3	
FIGO Stadium	88				.23
I/ II		15	5	33.3	
III/ IV		73	14	19.2	
Lymphknotenmetastasen	38				.02
pN <sub>0</sub>		15	7	46.7	
pN <sub>1</sub>		23	3	13.0	
Grading	84				.47
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>		39	7	17.9	
G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub>		45	11	24.4	
Postoperativer Tumorrest	62				.91
mikroskopisch		38	9	27.3	
makroskopisch		24	6	25.0	
Aszites	89				.87
nein		36	8	23.7	
ja		53	11	20.8	
Peritonealkarzinose	88				.99
nein		14	3	21.4	
ja		74	16	21.6	
Lymphangiome	87				.10
nein		60	16	26.7	
ja		27	3	11.1	
Hämangiome	89				.35
nein		79	18	22.8	
ja		10	1	10.0	

\* Gesamtzahl der Patientinnen, bei denen der entsprechende Faktor untersucht wurde.

\*\* $\chi^2$  – Test

**Tabelle 8.** Patientinnencharakteristika und histologische Tumorparameter in Korrelation zu der Anwesenheit von CK positiven Zellen in Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.

### **4.3. HER- 2/neu Proteinexpressions- und Amplifikationsrate**

#### **4.3.1. Immunhistochemie**

Die Ovarialkarzinomschnitte aller 89 Patientinnen wurden auf HER-2/neu- Protein mittels Immunhistochemie untersucht. 44 (49,3%) Tumoren wurden als 0, 20 (22,5%) als 1+, 19 (21,3%) als 2+ und 6 (6,7%) als 3+ eingestuft. Zusammenfassend waren 64 (71,9%) Tumoren HER-2/neu negativ (0, 1+) und 25 (28,1%) positiv (2+, 3+).

Es wurde keine Korrelation zwischen der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Positivität und prognostischen Faktoren wie fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenbefall, geringe Tumordifferenzierung, makroskopischem Tumorrest, Peritonealkarzinose, Hämangiose, Lymphangiose und Aszites festgestellt (s. Tabelle 9).

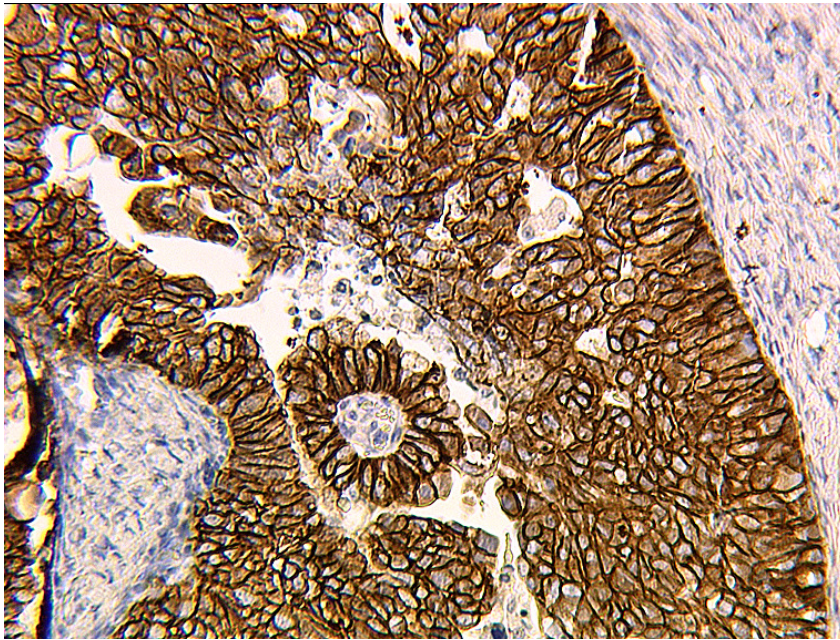
Die Mehrzahl der Ovarialkarzinome mit einer HER-2/neu Proteinexpression von 2+/3+ (n = 25) waren serös-papillär (n = 21; 84,0%), 2 (8,0%) wurden als Adenokarzinome ohne weitere Histologieangaben und eines (4,0 %) als Klarzellkarzinom definiert. Für ein HER-2/neu IHC (Immunhistochemie) positives Ovarialkarzinom gab es keine histologische Angaben.

Variable	Anzahl der Patientinnen		HER-2/neu IHC positiv		p**
	Gesamt*	Anteil	Anzahl	%	
Gesamtzahl der Patientinnen	89		25	28.1	
FIGO Stadium	88				.16
I/ II		15	2	13.5	
III/ IV		73	23	31.5	
Lymphknotenmetastasen	38				.80
pN <sub>0</sub>		15	4	26.7	
pN <sub>1</sub>		23	7	30.4	
Grading	84				.30
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>		39	9	23.1	
G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub>		45	15	33.3	
Postoperativer Tumorrest	62				.89
mikroskopisch		38	12	31.6	
makroskopisch		24	8	33.3	
Aszites	89				.67
nein		36	11	30.6	
ja		53	14	26.4	
Peritonealkarzinose	88				.51
nein		14	5	35.7	
ja		74	20	27.0	
Lymphangiiose	87				.78
nein		60	16	26.7	
ja		27	8	29.6	
Hämangiiose	89				.37
nein		79	21	26.6	
ja		10	4	40.0	

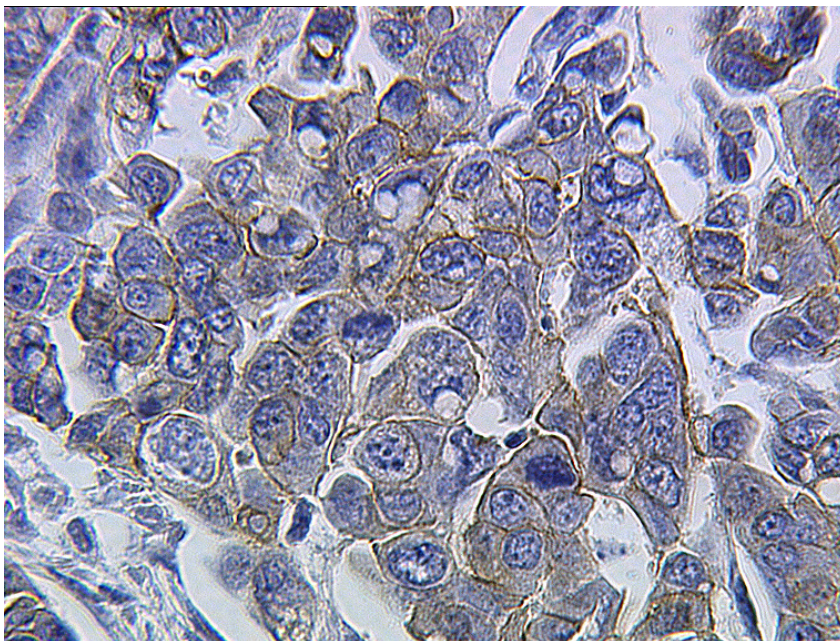
\* Gesamtzahl der Patientinnen, bei denen der entsprechende Faktor untersucht wurde.

\*\* $\chi^2$  – Test

**Tabelle 9.** Patientinnencharakteristika und histologische Ovarialkarzinomparameter in Korrelation zu der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Proteinexpression zum Zeitpunkt der Primärdiagnose. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.



**Abbildung 3.** Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Protein Überexpression 3+. Ausschnitt aus dem Präparat Nr. 1112\_99 nach einer immunchistochemischen Färbung. Starke braune Membranfärbung der HER-2/neu positiven Zellen.



**Abbildung 4.** Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Protein-expression 1+. Ausschnitt aus dem Präparat Nr. 1652\_97 nach einer immunchistochemischen Färbung. Schwache braune Membranfärbung der Tumorzellen.

### 4.3.2. Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung

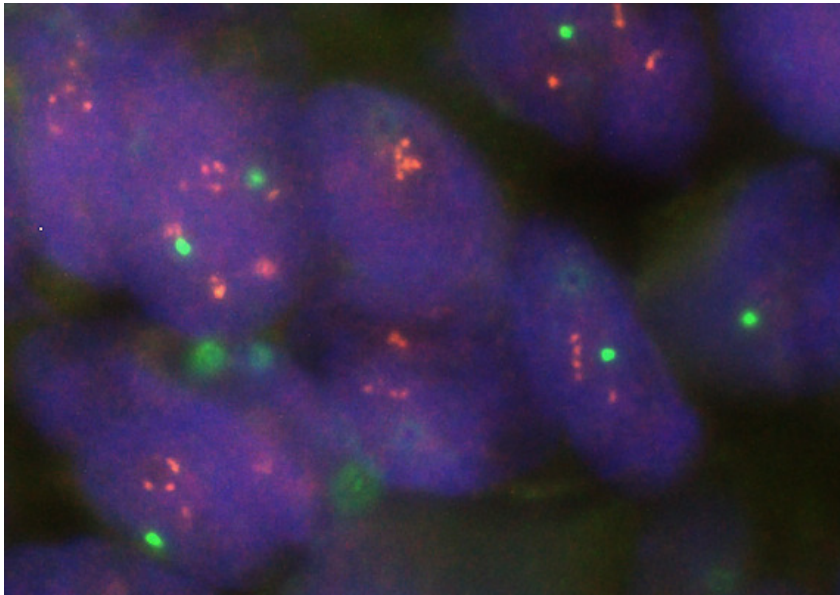
Variable	Anzahl der Patientinnen		HER-2/neu FISH positiv		p**
	Gesamt*	Anteil	Anzahl	%	
Gesamtzahl der Patientinnen	89		9	10.1	
FIGO Stadium	88				.15
I/ II		15	0	0	
III/ IV		73	9	12.3	
Lymphknotenmetastasen	38				.32
pN <sub>0</sub>		15	2	13.3	
pN <sub>1</sub>		23	1	4.3	
Grading	84				.40
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>		39	3	7.7	
G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub>		45	6	13.3	
Postoperativer Tumorrest	62				.95
mikroskopisch		38	3	7.9	
makroskopisch		24	2	8.3	
Aszites	89				.80
nein		36	4	7.9	
ja		53	5	9.4	
Peritonealkarzinose	88				.68
nein		14	1	7.1	
ja		74	8	10.8	
Lymphangiose	87				.09
nein		60	4	6.7	
ja		27	5	18.5	
Hämangiose	89				.03
nein		79	6	7.6	
ja		10	3	30.0	

\* Gesamtzahl der Patientinnen, bei denen der entsprechende Faktor untersucht wurde.

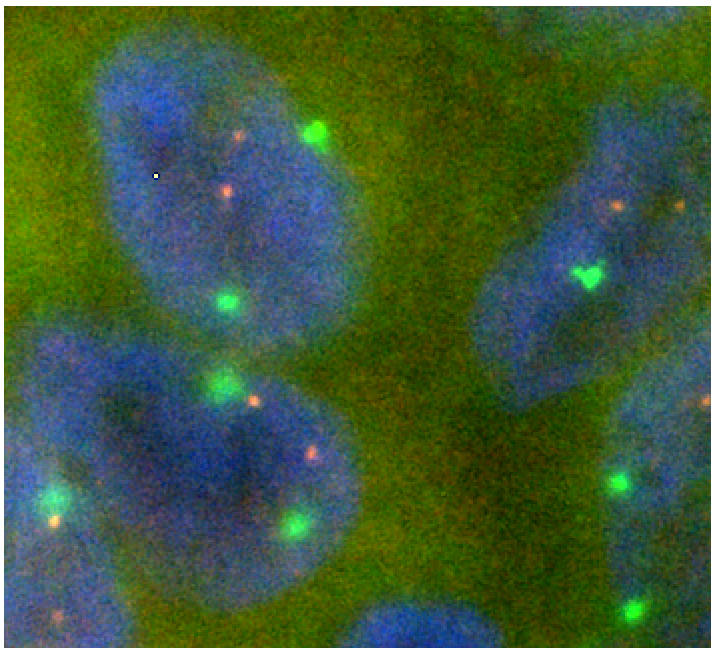
\*\* $\chi^2$  – Test

**Tabelle 10.** Patientinnencharakteristika und histologische Ovarialkarzinomparameter in Korrelation zu der mittels FISH nachgewiesenen HER-2/neu Genamplifikation zum Zeitpunkt der Primärdiagnose. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.





**Abbildung 5.** Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Gen  
Amplifikationsrate  $> 2$ . Ausschnitt aus dem Präparat von Patientin Nr.  
0247\_01\_2. Man erkennt die Zellkerne (blau) mit zwei grünen  
(Zentromere) und mehreren roten (HER-2/neu Gene) Signalen.



**Abbildung 6.** Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Gen  
Amplifikationsrate von 2.0. Ausschnitt aus dem Präparat Nr.  
1190\_96\_I.3 nach einer FISH- Färbung. Die blauen Zellkerne  
haben jeweils zwei grüne (Zentromere) und zwei rote (HER-  
2/neu Gene) Signale.

Die HER-2/neu Genamplifikationsrate wurde mittels FISH bei allen 89 Ovarialkarzinomen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten bei 9 Tumorschnitten (10,1%) eine Signalratio LSI HER-2/CEP 17  $\geq$  2.0. Die HER-2/neu Genamplifikation korrelierte mit der Hämangiose, nicht aber mit dem Tumorstadium, dem Nodalstatus, dem Grading, dem makroskopischen postoperativen Tumorrest, dem Aszites, der Peritonealkarzinose, der Lymphangiose und den tumorzellpositiven Knochenmark-ergebnissen (s. Tabelle 10).

77, 8% (n = 7) der Patientinnen mit eine HER-2/neu Amplifikationsrate  $> 2$  (n = 9) hatten ein serös-papilläres Adenokarzinom, eine Patientin hatte ein Klarzellkarzinom und bei einer war die Histologie des Tumors nicht genau definiert.

#### 4.4. Korrelation der HER-2/neu IHC 2+/3+ Proteinexpression und Genamplifikation mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.

##### 4.4.1. Korrelation zwischen der HER-2/neu IHC 2+/3+ Proteinexpression und der HER-2/neu Genamplifikation

Eine signifikante Korrelation fand sich zwischen der HER-2/neu IHC Positivität und der HER-2/neu Genamplifikation ( $p < 0,001$ , s. Tabelle 11).

HER-2/neu IHC	HER-2/neu FISH	Patientinnenzahl	% HER-2/neu FISH pos
0	neg	43	
	pos	1	2.3
1+	neg	19	
	pos	1	5.0
2+	neg	16	
	pos	3	11.1
3+	neg	2	
	pos	4	57.1

**Tabelle 11.** Korrelation zwischen dem immunhistochemisch und dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.  $\chi^2$  – Test.

$p < .001$

#### 4.4.2. Korrelation zwischen dem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Proteinexpression

Es fand sich keine Korrelation zwischen einem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu IHC Positivität (s. Tabelle 12).

HER-2/neu IHC	CK	Patientinnenzahl	% CK pos
0	neg	33	
	pos	11	25.0
1+	neg	18	
	pos	2	10.0
2+	neg	13	
	pos	6	31.6
3+	neg	6	
	pos	0	0

**Tabelle 12.** Korrelation zwischen dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.  $\chi^2$  – Test.  $p = .20$

#### 4.4.3. Korrelation zwischen dem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Genamplifikation

Ebenso wurde keine Korrelation zwischen einem positiven Knochenmarkstatus und der HER-2/neu Genamplifikation (s. Tabelle 13) gefunden.

HER-2/neu FISH	CK	Patientinnenzahl	% CK pos
neg	neg	62	
	pos	18	22.5
pos	neg	8	
	pos	1	11.1

**Tabelle 13.** Korrelation zwischen dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Gesamtzahl der Patientinnen ist 89.  $\chi^2$  – Test.  $p = .43$

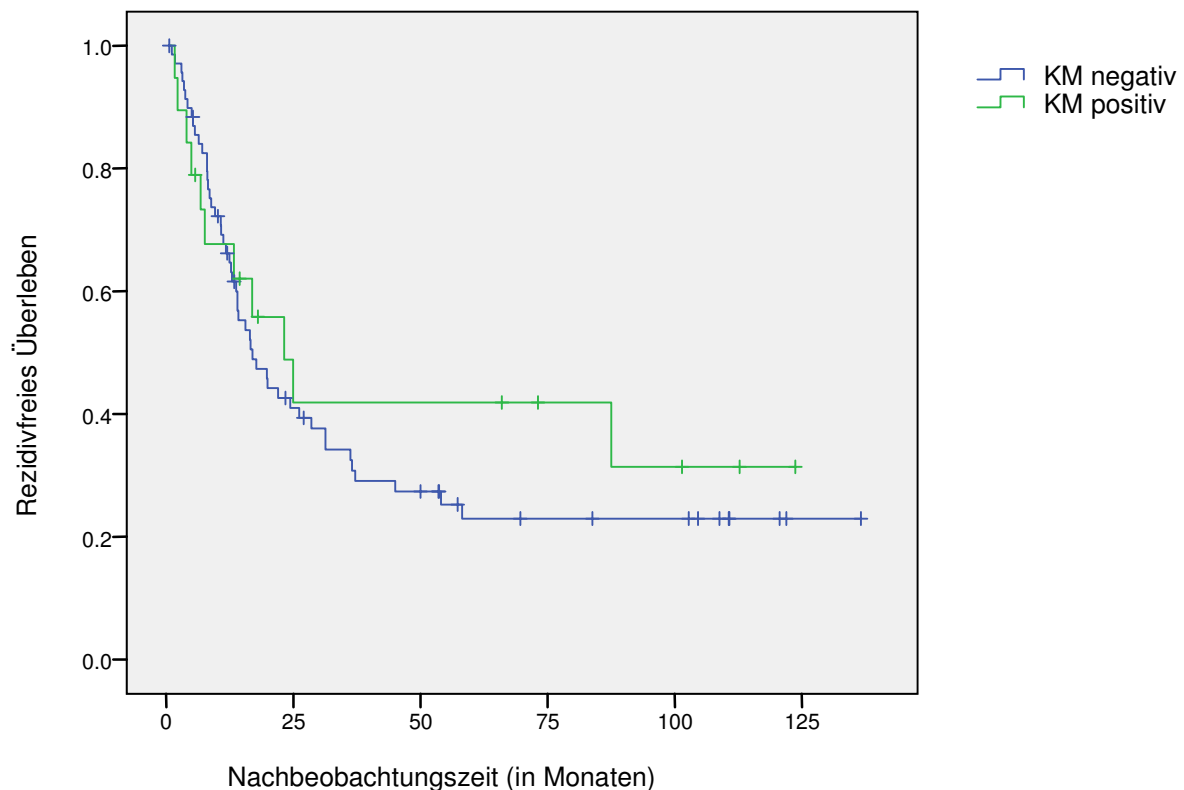
## 4.5. Nachbeobachtung

### 4.5.1. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen

#### 4.5.1.1. Univariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen

Die mittlere Nachbeobachtungszeit der Patientinnen betrug 62,5 Monate (1 – 124). Von den 89 Patientinnen bekamen 60 (67,4%) ein Lokalrezidiv. 59 Patientinnen hiervon (98,3%) starben an der Ovarialkarzinomerkrankung.

#### 4.5.1.1a. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus



**Abbildung 7.** Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus. Log Rank  $p = .52$

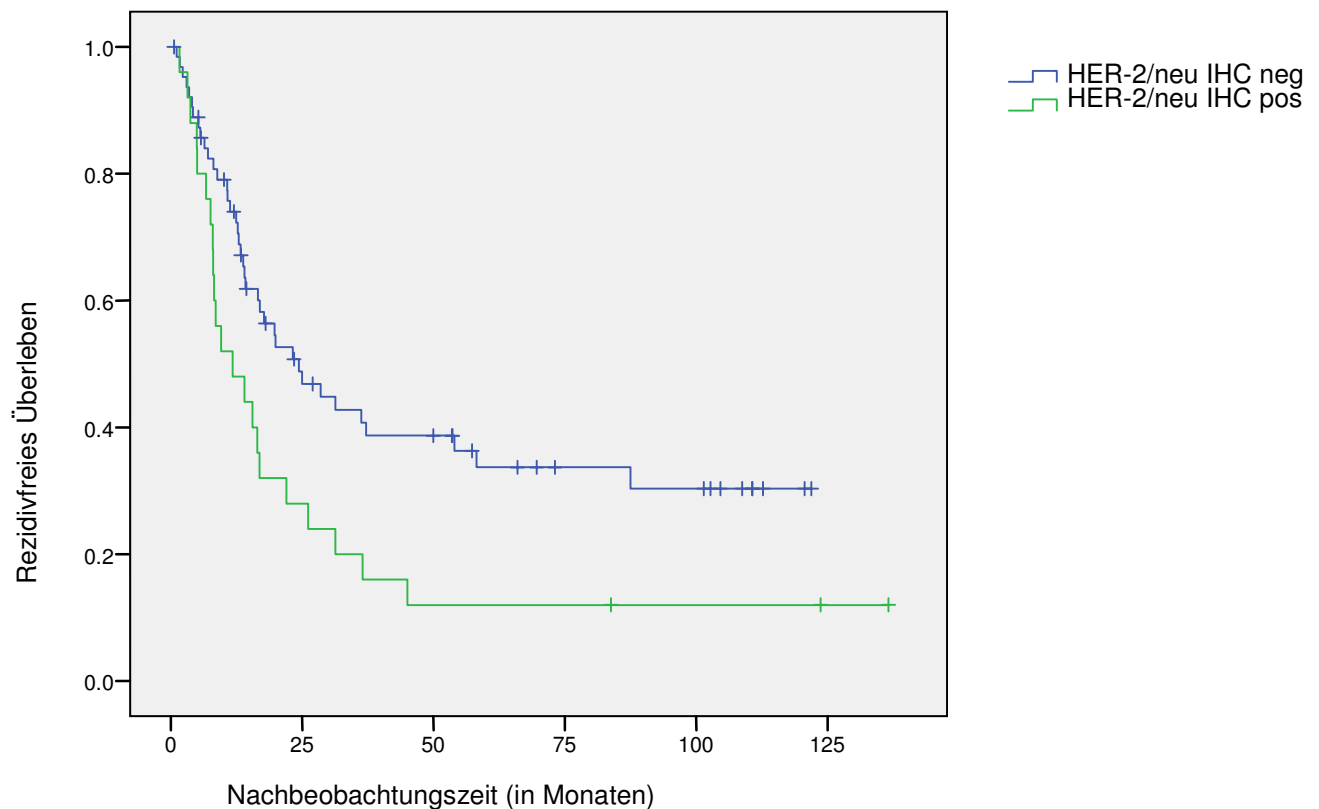
In Abbildung 7 sind die Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben bei positivem Knochenmarkstatus versus negativen Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven mit positivem Knochenmarkstatus und negativem Knochenmarkstatus (mediane rezidivfreie Überlebenszeit 17 Monate [212]) konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,52$ , Log Rank Test). Von den 60 Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, hatten 11 (18,3%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark. Von den 29 rezidivfreien Patientinnen hatten 8 (27,6%) einen positiven Knochenmarkbefund.

Im Bezug auf das rezidivfreie Überleben zeigte sich keine Korrelation zum Knochenmarkstatus. In der Patientinnengruppe mit positivem Knochenmarkbefall ( $n=19$ ) war die Rezidivhäufigkeit 57,9% ( $n=11$ ). In der Knochenmark negativen Gruppe ( $n=70$ ) war sie 70,0% ( $n=49$ ) (s. Tabelle 14).

	KM - Status		Gesamtzahl
	CK positiv (%)	CK negativ (%)	
kein Rezidiv (%)	8 (27.6)	21 (72.4)	29
Rezidiv (%)	11 (18.3)	49 (81.7)	60

**Tabelle 14.** Korrelation zwischen Rezidivereignissen und dem Knochenmarkstatus.  $p = .32$

#### 4.5.1.1b. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu 2+/3+ Proteinexpression



**Abbildung 8.** Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis. Log Rank,  $p = .02$

In Abbildung 8 sind die Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen bei immunhistochemisch positivem versus immunhistochemisch negativem HER-2/neu Staus dargestellt. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei einem positiven und negativen immunhistochemischen HER-2/neu Nachweis (mediane rezidivfreie Überlebenszeit 24 Monate {11- 37 CI 95%}) festgestellt werden,  $p = 0.02$ , Log Rank Test.

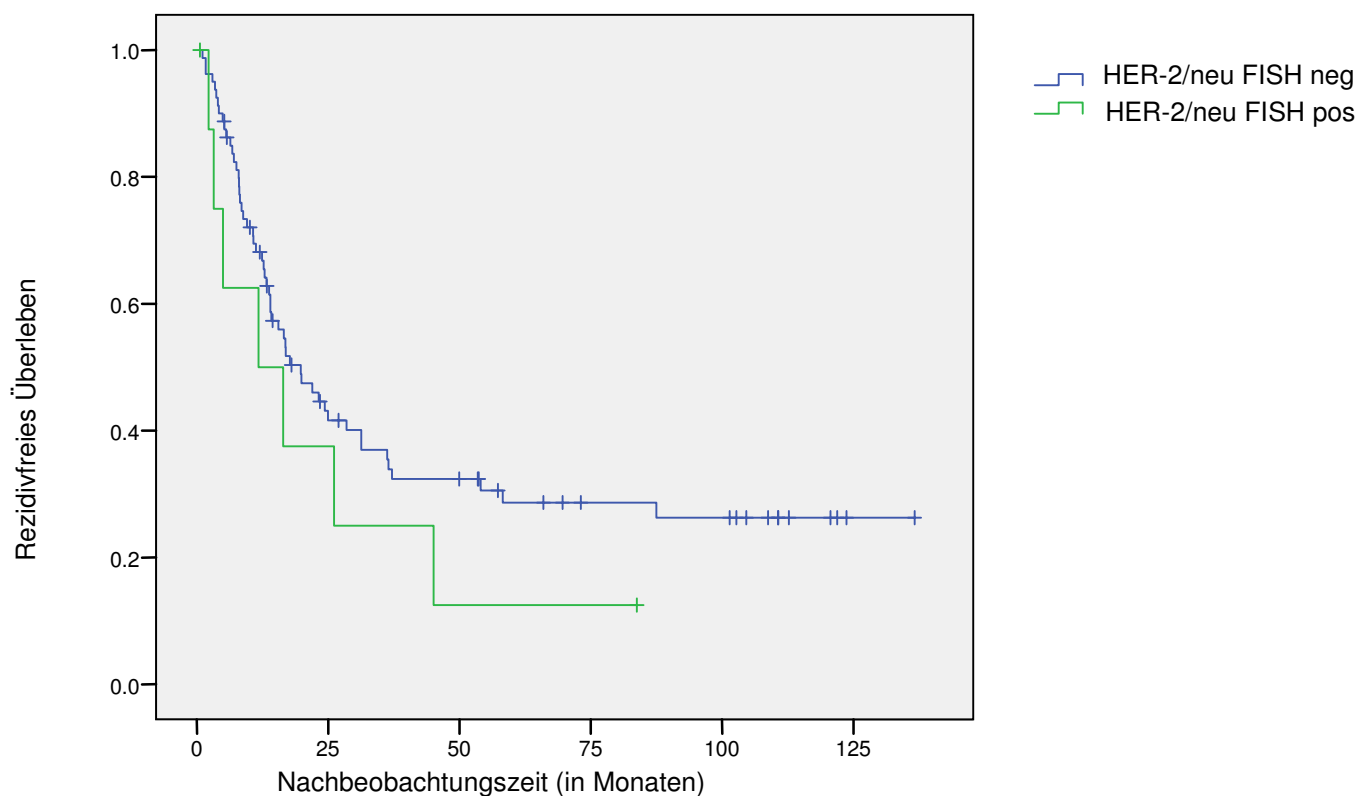
22 (36,7%) von den 60 Patientinnen, die ein Rezidiv bekamen und 3 (10,3%) von den 29 rezidivfreien Patientinnen waren bei der Primärdiagnose IHC HER-2/neu positiv.

Im Bezug auf das rezidivfreie Überleben konnte in diesem Kollektiv eine Korrelation zur HER-2/neu IHC Positivität hergestellt werden. Von den 25 Patientinnen mit positiven IHC HER-2/neu Status bekamen 22 Patientinnen ein Rezidiv und 3 Patientinnen blieben rezidivfrei. Von der Patientengruppe mit negativem IHC HER-2/neu Status (n=64) wurde bei 38 ein Rezidiv gefunden (s. Tabelle 15).

	IHC HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
kein Rezidiv (%)	3 (10.3)	26 (89.7)	29
Rezidiv (%)	22 (36.7)	38 (63.3)	60

**Tabelle 15.** Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .01$

#### 4.5.1.1c. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation



**Abbildung 9.** Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis. Log Rank  $p = .26$

Abbildung 9 zeigt die Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem und negativem FISH HER-2/neu Nachweis (mediane rezidivfreie Überlebenszeit 20 Monate {12- 28 CI 95%}) festgestellt werden,  $p = 0.26$  Log Rank Test.

Von den 60 Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, wurde bei 7 (11,7%) eine positive, mittels FISH bestimmte HER-2/neu Genamplifikationsrate nachgewiesen. Von den 29 rezidivfreien Patientinnen waren 2 (6,9%) FISH HER-2/neu positiv.

Bei den Patientinnen mit einer HER-2/neu Rate  $> 2$  zeigte sich keine signifikant höhere Rezidivrate. Ein Rezidiv bekamen 7 von den FISH HER-2/neu positiven Patientinnen (N=9) und 53 von der Gruppe der FISH HER-2/neu negativen Patientinnen (N=80) (s. Tabelle 16).

	FISH HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
kein Rezidiv (%)	2 (6.9)	27 (93.1)	29
Rezidiv (%)	7 (11.7)	53 (88.3)	60

**Tabelle 16.** Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .48$

#### 4.5.1.1d. Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren

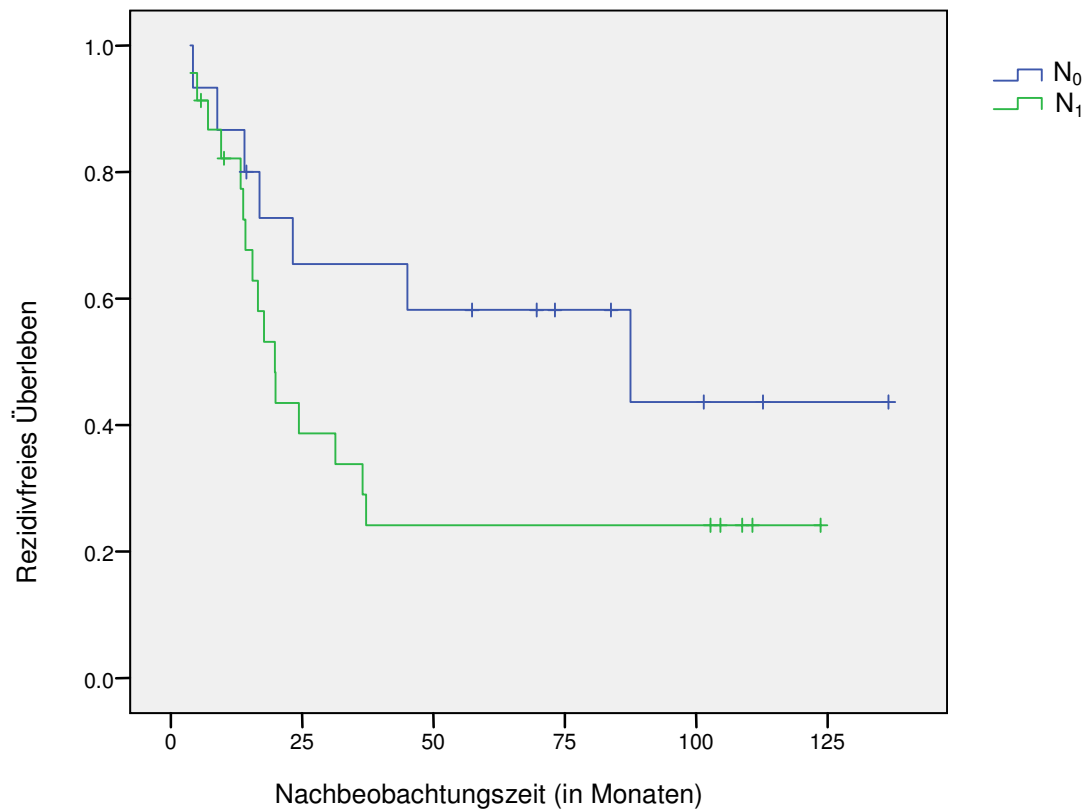
Die univariate Analyse wies eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem rezidivfreien Überleben und klassischen prognostischen Faktoren, wie fortgeschrittenes FIGO-Stadium, Lymphknotenbefall, makroskopischer Tumorrest, Anwesenheit von Aszites und Peritonealkarzinose nach (s. Abbildung 10 und 11). Keine signifikante Korrelation bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte für die Faktoren Grading, Lymphangiome und Hämangiome festgestellt werden (s. Tabelle 17).



Variable	Log Rank p
FIGO Stadium (n = 88) I/ II vs III/ IV	.001
Nodalstatus (n = 38) pN <sub>0</sub> vs pN <sub>1</sub>	.023
Grading (n = 84) G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> vs G <sub>3</sub>	.11
Tumorrest (n = 62) mikro- vs makroskopisch	.012
Aszites (n = 89) ja/ nein	.004
Peritonealkarzinose (n = 88) ja/nein	.010
Lymphangiome (n = 87) ja/nein	.30
Hämangiome (n = 89) ja/nein	.11

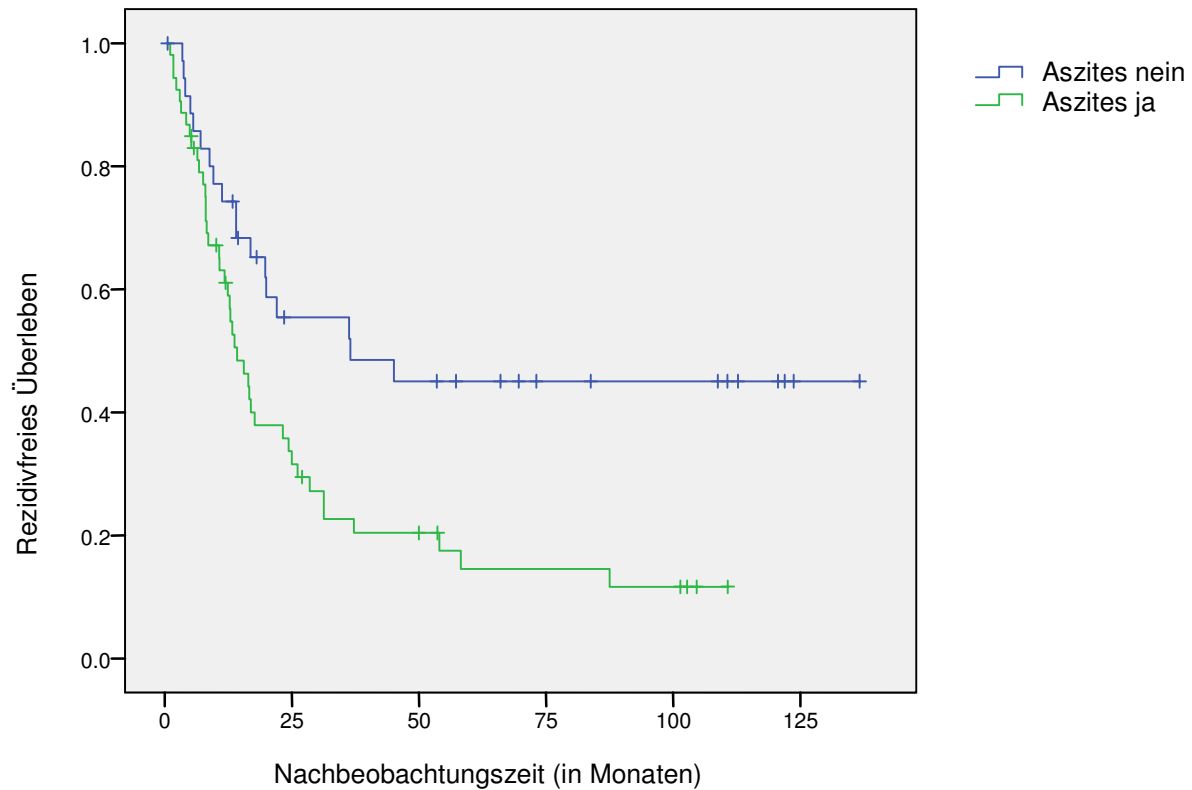
**Tabelle 17.** Univariate Analyse nach Kaplan-Meier für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von klassischen prognostischen Faktoren

Da eine unterschiedliche Zahl an Patientinnen nach den verschiedenen prognostischen Faktoren untersucht wurde, ergeben sich folgende Daten bei der Primärdiagnose: 55 (91,2%) von den 60 Patientinnen, die ein Rezidiv bekamen, hatten ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium, beziehungsweise 16 (69,6%) von 23 hatten einen Lymphknotenbefall, 32 (71,1%) von 45 hatten eine hohes Grading, 18 (75,0%) von 24 hatten einen makroskopischen Tumorrest, 42 (79,2%) von 53 hatten Aszites, 54 (73,0%) von 74 hatten eine Peritonealkarzinose und 20 (74,1%) von 27 hatten eine Lymphangiome. Von den Patientinnen, die bei der Primärdiagnose eine Hämangiome aufwiesen, entwickelten alle ein Rezidiv.



**Abbildung 10.** Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus. Log Rank  $p = .023$

Bei der Primärdiagnose hatten 17 Patientinnen (58,6%) von 29 rezidivfreien Patientinnen ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium, beziehungsweise 7 (30,4%) von 23 einen Lymphknotenbefall, 13 (28,9%) von 45 eine hohes Grading, 6 (25,0%) von 24 hatten einen makroskopischen Tumorrest, 11 (20,8%) von 53 Aszites, 40 (54,1%) von 74 hatten eine Peritonealkarzinose und 6 (22,2%) von 27 hatten eine Lymphangiome.



**Abbildung 11.** Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von Aszites bei Primärdiagnose. Log Rank  $p = .004$

#### 4.5.1.2. Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die Peritonealkarzinose ( $p = .008$ ), die Hämangiose ( $p = .032$ ) und die IHC HER-2/neu Positivität ( $p = 0.001$ ) als unabhängige Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben gelten (s. Tabelle 18).

Variable	Patientenzahl	RR*	95 % CI**		p***
			Untere	Obere	
FIGO Stadium I /II vs III/ IV	15/ 88 vs 73/ 88	4.103	0.950	17.725	0.059
Lymphknotenmetastasen pN <sub>0</sub> vs pN <sub>1</sub>	15/ 38 vs 23/ 38	0.188	0.027	1.288	0.089
Grading G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> vs G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub>	39/ 84 vs 45/ 84	3.395	0.813	14.176	0.094
Postoperativer Tumorrest mikro- vs makroskopisch	38/ 62 vs 24/ 62	1.380	0.278	6.852	.693
Aszites nein; ja	36/ 89; 53/ 89	0.863	0.242	3.075	.820
Peritonealkarzinose nein; ja	14/ 88; 74/ 88	5.452	1.557	19.085	.008
Lymphangiome nein; ja	60/ 87; 27/ 87	0.354	0.079	1.576	.173
Hämangiome nein; ja	79/ 89; 10/ 89	36.801	1.368	990.145	.032
Knochenmarkstatus CK neg; CK pos	70/ 89; 19/ 89	0.136	0.015	1.256	.079
HER-2/neu IHC neg; pos	64/ 89; 25/ 89	3.211	1.605	6.425	.001
HER-2/neu FISH neg; pos	80/ 89; 9/ 89	0.233	0.017	3.136	.272

\* - Relatives Risiko

\*\* - Konfidenzintervall

\*\*\* - Cox Regression

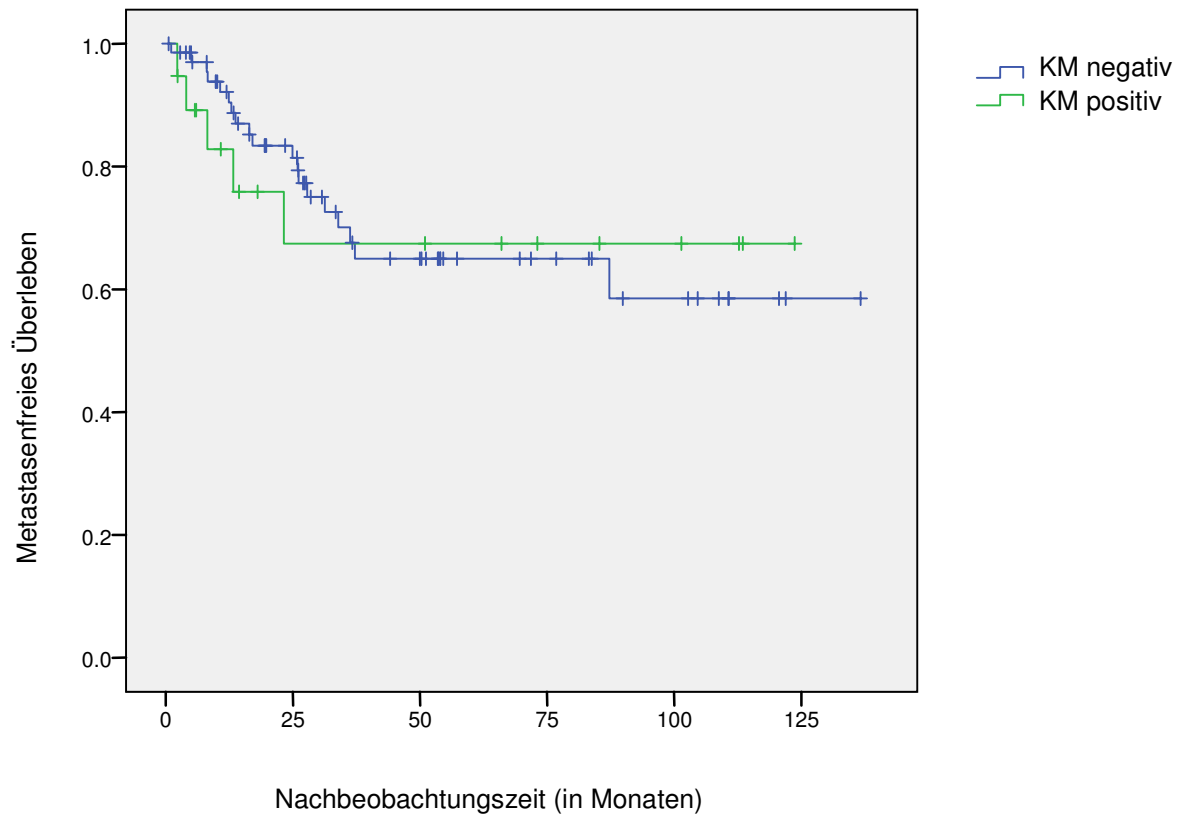
**Tabelle 18.** Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen

#### 4.5.2. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen

##### 4.5.2.1. Univariate Analyse für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen

Während der Beobachtungszeit entwickelten 24 (27,0%) von den 89 untersuchten Patientinnen Metastasen, von denen alle an der Ovarialkarzinomkrankung starben. Von den 65 metastasenfreien Patientinnen, erlitten 36 (55,4%) ein Rezidiv und 44 (67,7%) starben an die Folgen des Ovarialkarzinoms.

#### 4.5.2.1a. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus



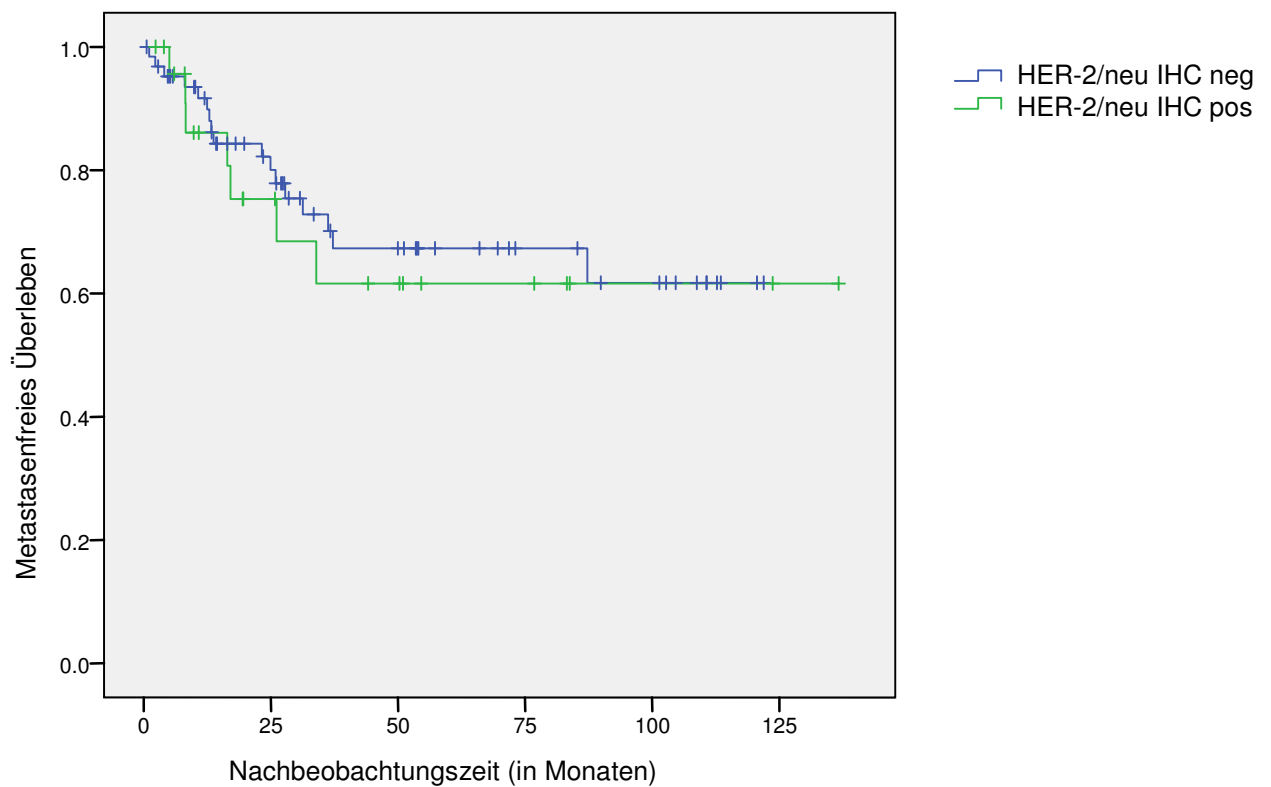
**Abbildung 12.** Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus. Log Rank  $p = .87$

In Abbildung 12 sind die Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben bei positivem Knochenmarkstatus versus negativem Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem Knochenmarkstatus und negativem Knochenmarkstatus konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,87$ , Log Rank Test). Von den 24 Patientinnen, die Metastasen entwickelten, hatten 5 (20,8%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark. Von den 65 metastasenfreien Patientinnen hatten 14 (21,5%) einen positiven Knochenmarkbefund. 5 von 19 KM positiven (26,3%) und 19 von 70 KM negativen Patientinnen (27,1%) entwickelten Fernmetastasen.

	KM - Status		Gesamtzahl
	CK positiv (%)	CK negativ (%)	
keine Metastasen (%)	14 (21.5)	51 (78.5)	65
Metastasen (%)	5 (20.8)	19 (79.2)	24

**Tabelle 19.** Korrelation vom Metastasenauftreten mit dem Knochenmarkstatus.  $p = .94$

#### 4.5.2.1b. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Proteinexpression



**Abbildung 13.** Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis. Log Rank  $p = .66$

In der Abbildung 13 sind die Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen bei immunhistochemisch positivem sowie bei immunhistochemisch negativem HER-2/neu Status dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven festgestellt werden ( $p = 0,66$ , Log Rank Test).

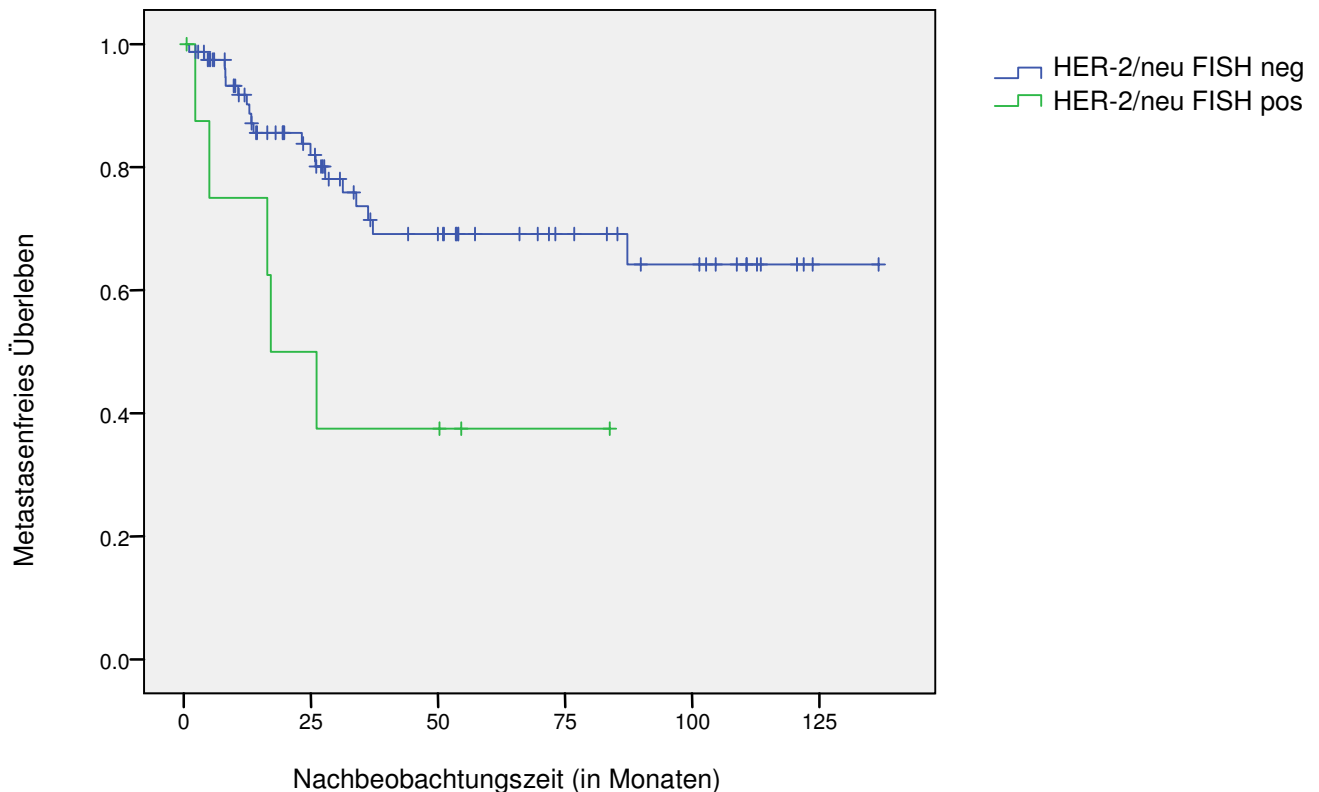
7 (29,2%) von den 24 Patientinnen, die Metastasen entwickelten und 18 (27,7%) von den 65 metastasenfreien Patientinnen waren bei der Primärdiagnose IHC HER-2/neu positiv.

In Bezug auf das metastasenfreie Überleben konnte in diesem Kollektiv keine Korrelation zur HER-2/neu IHC Positivität hergestellt werden. Von den 25 Patientinnen mit positivem IHC HER-2/neu Status fanden sich bei 7 Patientinnen Metastasen und 18 Patientinnen blieben metastasenfrei. Von der Patientengruppe mit negativem IHC HER-2/neu Status ( $n = 65$ ) wurden bei 17 Metastasen gefunden (s. Tabelle 20).

	IHC HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
<b>keine Metastasen (%)</b>	18 (27.7)	47 (72.3)	65
<b>Metastasen (%)</b>	7 (29.2)	17 (70.8)	24

**Tabelle 20.** Korrelation des metastasenfreien Überlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .89$

#### 4.5.2.1c. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation



**Abbildung 14.** Kaplan-Meier Kurve für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis. Log Rank  $p = .02$

Abbildung 14 zeigt die Kaplan - Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation. Die Patientinnen mit einem positiven FISH HER-2/neu Nachweis entwickelten signifikant früher Fernmetastasen,  $p = 0.02$  (Log Rank Test).

Von den 24 Metastasen - befallenen Patientinnen wurde bei 5 (20,8%) eine positive mittels FISH bestimmte HER-2/neu Genamplifikationsrate nachgewiesen. Von den 65 Metastasen - freien Patientinnen waren 4 (6,15%) FISH HER-2/neu positiv.



Metastasen entwickelten 5 von den FISH HER-2/neu positiven Patientinnen (N=9) und 19 von der Gruppe der FISH HER-2/neu negativen Patientinnen (N=80) (s. Tabelle 21).

	FISH HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
<b>keine Metastasen (%)</b>	4 (6,15)	61 (93,8)	65
<b>Metastasen (%)</b>	5 (20,8)	19 (79,2)	24

**Tabelle 21.** Korrelation des metastasenfreien Überlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .04$

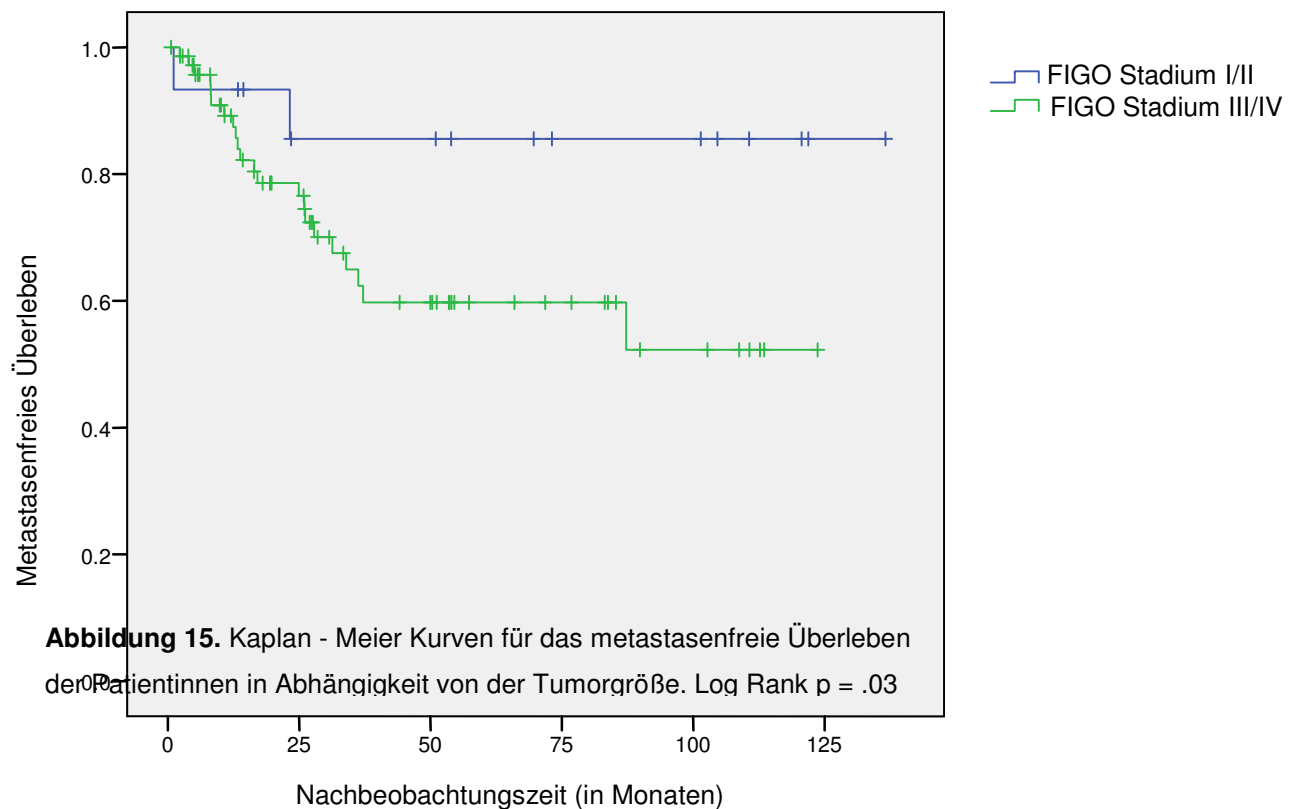
#### 4.5.2.1d. Metastasenfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren

Die univariate Analyse wies eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem metastasenfreien Überleben und den klassischen prognostischen Faktoren, wie Lymphknotenbefall, der Anwesenheit von Aszites und Peritonealkarzinose nach. Keine signifikante Korrelation bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte für die Faktoren Tumorgrosse, Grading, Tumorstadium, Lymphangiogenese und Hämangiogenese festgestellt werden (s. Tabelle 22).

Variable	Log Rank p
FIGO Stadium (n = 88) I/ II vs III/ IV	.092
Nodalstatus (n = 38) pN <sub>0</sub> vs pN <sub>1</sub>	.013
Grading (n = 84) G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> vs G <sub>3</sub>	.051
Tumorstadium (n = 62) mikro- vs makroskopisch	.061
Aszites (n = 89) ja/ nein	.002
Peritonealkarzinose (n = 88) ja/nein	.027
Lymphangiogenese (n = 87) ja/nein	.75

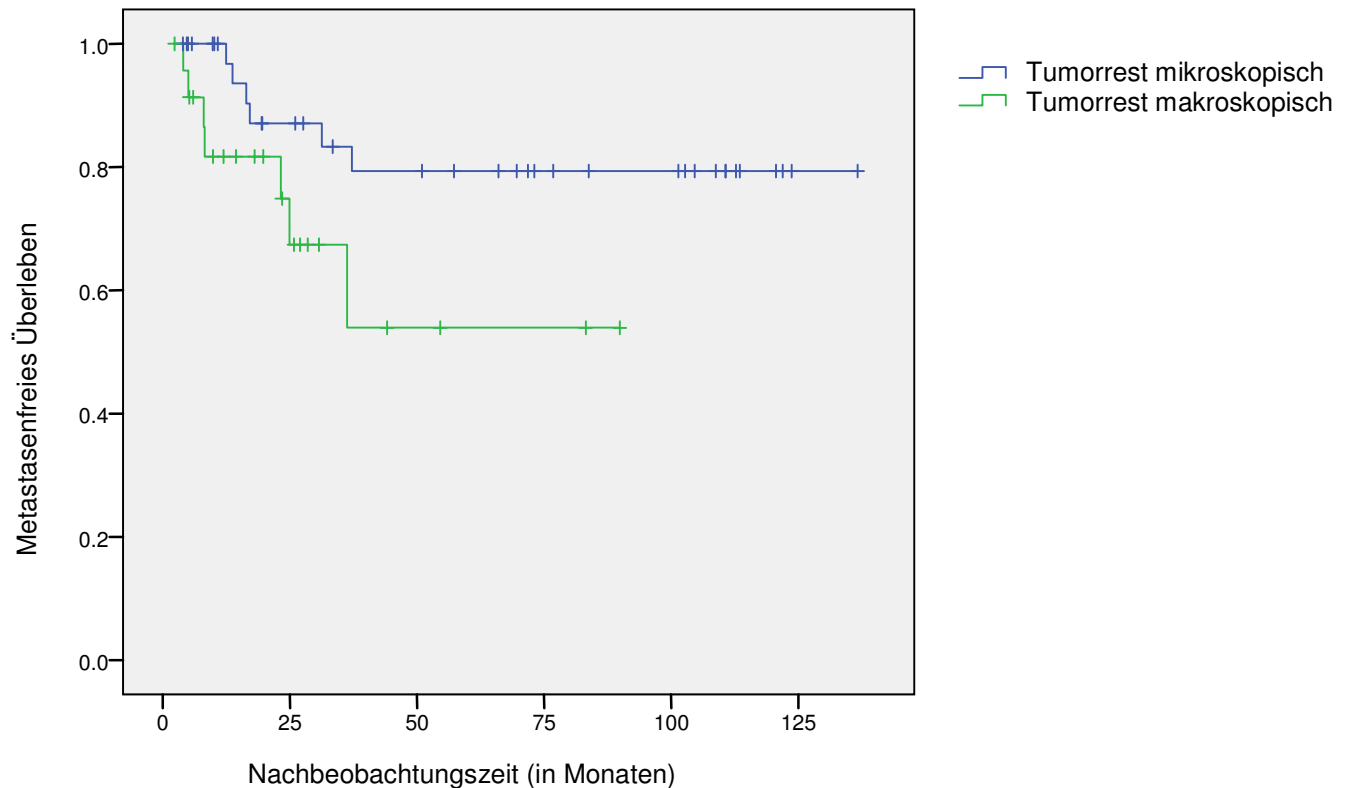
Hämangiose (n = 89)	.08
ja/nein	

**Tabelle 22.** Univariate Analyse nach Kaplan - Meier für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von einigen klassischen prognostischen Faktoren



**Abbildung 15.** Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium. Log Rank  $p = .092$

Die Abbildungen 15 und 16 stellen das metastasenfreie Überleben in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium und vom postoperativen Tumorrest dar. Die Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant. Man sieht jedoch eine deutlich niedrigere Überlebensrate in den Patientinnenkollektiven mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einen makroskopischen Tumorrest.



**Abbildung 16.** Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben in Abhängigkeit vom Nachweis eines postoperativen Tumorrests. Log Rank  $p = .061$

Die Analyse der Patientinnen im Bezug auf das metastasenfreie Überleben und die verschiedenen prognostischen Faktoren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ergaben: 22 (91,7%) von den 24 Patientinnen, die Metastasen entwickelten, hatten ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium, beziehungsweise 19 (82,6%) von 23 hatten einen Lymphknotenbefall, 14 (31,1%) von 45 hatten einen hohen Grading, 10 (41,7 %) von 24 hatten einen makroskopischen Tumorrest, 41 (77,4%) von 53 hatten ein Aszites, 68 (9,9%) von 74 hatten eine Peritonealkarzinose, 6 (60,0%) von 10 hatten eine Hämangiose und 8 (29,6%) von 27 hatten eine Lymphangiose.

#### 4.5.2.2. Multivariate Analyse für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen

Ein signifikanter unabhängiger Prognosefaktor für das metastasenfreie Überleben konnte nicht evaluiert werden.

#### **4.5.3. Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen**

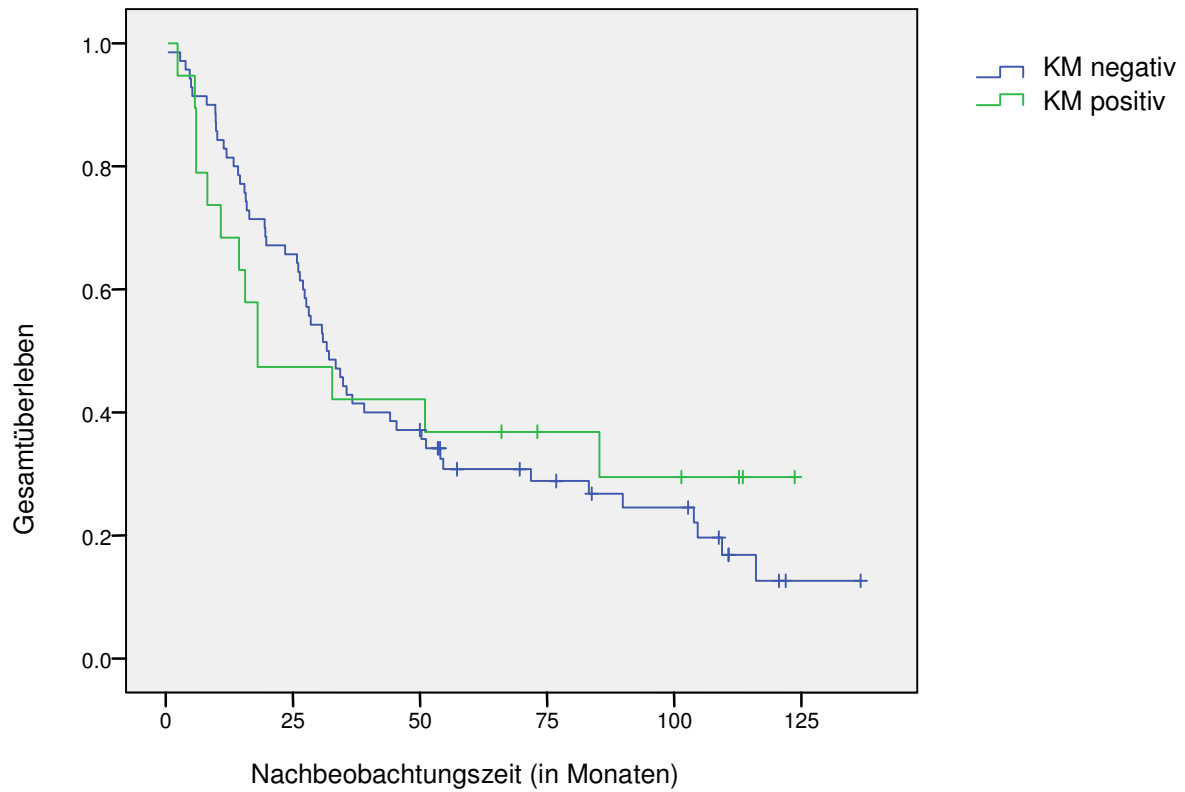
68 (76,4%) Patientinnen sind aufgrund des Ovarialkarzinoms gestorben. Die mittlere Überlebensdauer vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod betrug 31 Monate. Die 2-Jahresüberlebensrate betrug 62,2%. Nach 5 Jahren betrug das Gesamtüberleben 26,7%.

##### **4.5.3.1. Univariate Analyse**

##### **4.5.3.1a. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.**

In Abbildung 17 sind die Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen bei positivem Knochenmarkstatus sowie bei negativem Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Von den 68 Patientinnen, die an der Ovarialkarzinomkrankung gestorben sind, hatten 13 (19,1%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark. Von den 21 noch lebenden Patientinnen hatten 6 (28,6%) einen positiven Knochenmarkbefund. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem CK Status und negativem CK Status (mediane Gesamtüberlebenszeit 32 Monate {25-39; 95% CI}),  $p=0,81$ , Log Rank Test festgestellt werden.

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und dem Knochenmarkstatus. In der Gruppe der CK positiven Patientinnen verstarben 13 der Patientinnen. In der Gruppe der CK negativen Patientinnen verstarben 55 Patientinnen (s. Tabelle 24).

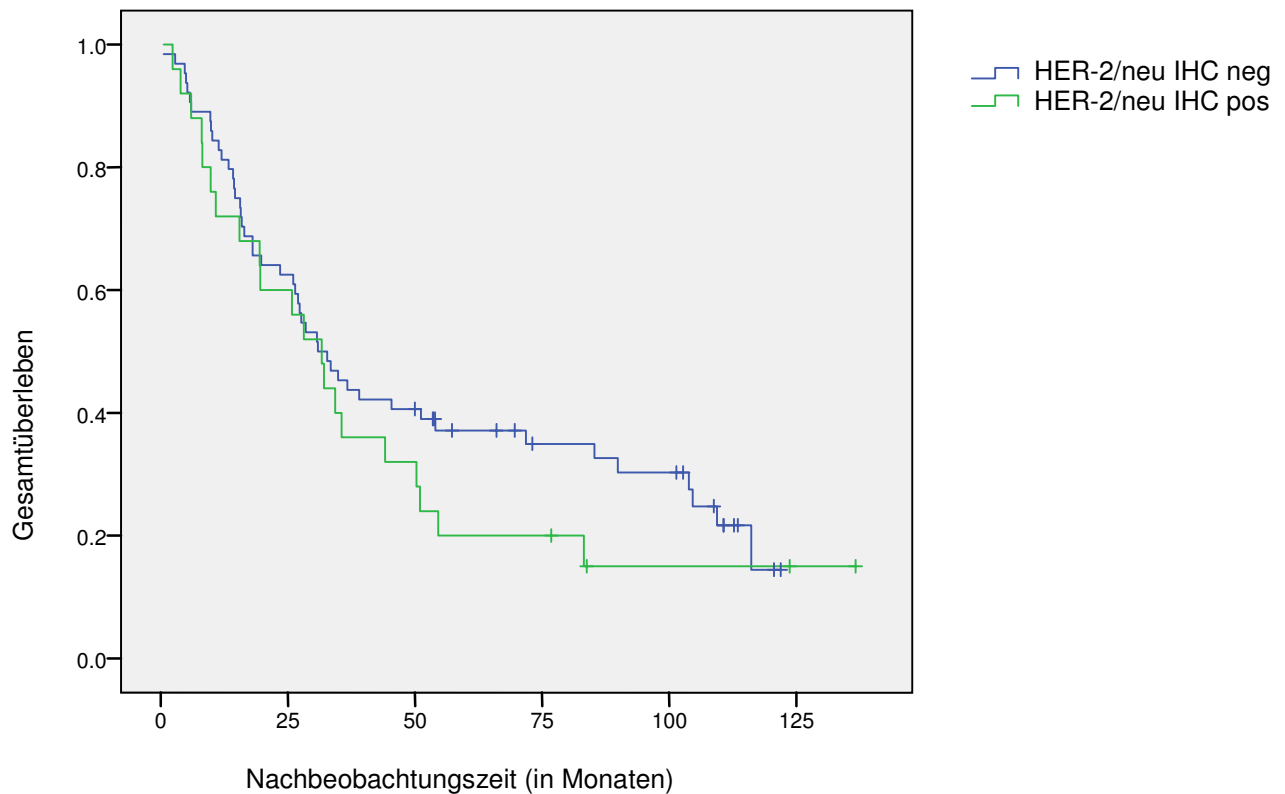


**Abbildung 17.** Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus. Log Rank  $p = .81$

	KM- Status		Gesamtzahl
	CK positiv (%)	CK negativ (%)	
lebend (%)	6 (28.6)	15 (71.4)	21
gestorben (%)	13 (19.1)	55 (80.9)	68

**Tabelle 24.** Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem Knochenmarkstatus.  $p = .36$

#### 4.5.3.1b. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Proteinexpression



**Abbildung 18.** Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis. Log Rank  $p = .32$

In Abbildung 18 sind die Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen bei immunhistochemisch positivem sowie immunhistochemisch negativem HER-2/neu Status dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven (mediane Gesamtüberlebenszeit 33 Monate {23-43 CI 95%}) konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,32$  (Log Rank Test)).

21 (30,9%) von den 68 an Ovarialkarzinom gestorbenen und 4 (19,0%) von den 21 noch lebenden Patientinnen waren bei Primärdiagnose IHC HER-2/neu positiv.

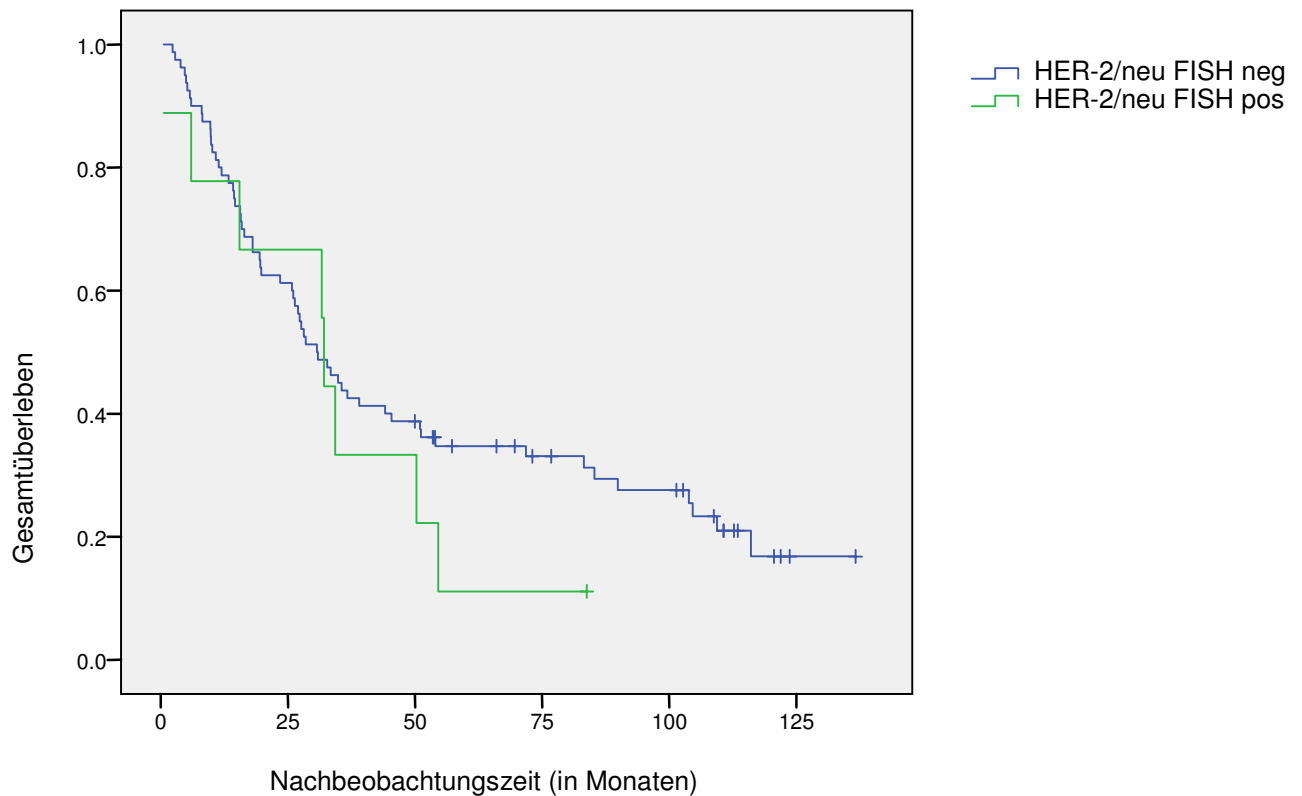
Im Bezug auf das Gesamtüberleben konnte in diesem Kollektiv ebenfalls keine

Korrelation zur HER-2/neu IHC Positivität festgestellt werden. Von den 25 Patientinnen mit positivem IHC HER-2/neu Status waren 21 Patientinnen verstorben und 4 Patientinnen überlebten. Von der Patientengruppe mit negativem IHC HER-2/neu Status (n=64) überlebten 17 und 47 verstarben (s. Tabelle 25).

	IHC HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
<b>lebend (%)</b>	4 (19.0)	17 (81.0)	21
<b>verstorben (%)</b>	21 (30.9)	47 (69.1)	68

**Tabelle 25.** Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .29$

#### 4.5.3.1c. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation



**Abbildung 19.** Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis. Log Rank  $p = .38$

Abbildung 19 zeigt die Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mittels FISH bestimmten HER-2/neu Genamplifikation. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei einem positiven und negativen FISH HER-2/neu Nachweis (mediane Gesamtüberlebenszeit 31 Monate {23-39 CI 95%}) festgestellt werden,  $p = 0.38$  Log Rank Test. Von den 68 Patientinnen, die an der Ovarialkarzinomkrankung gestorben sind, wurde bei 8 (11,8 %) eine positive mittels FISH bestimmte HER-2/neu Genamplifikationsrate nachgewiesen. Von den 21 noch lebenden Patientinnen war 1 (4,8%) FISH HER-2/neu positiv.

Keine Korrelation fand sich auch zwischen der HER-2/neu Genamplifikation und dem Gesamtüberleben. In der Gruppe der FISH HER-2/neu positiven Patientinnen (N=9) verstarben 8 der Patientinnen. In der Gruppe der FISH HER-2/neu negativen Patientinnen (N=80) verstarben 60 Patientinnen. (Tabelle 26).

	FISH HER-2/neu		Gesamtzahl
	positiv (%)	negativ (%)	
<b>lebend (%)</b>	1 (4.8)	20 (95.2)	21
<b>verstorben (%)</b>	8 (11.8)	60 (88.2)	68

**Tabelle 26.** Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.  $p = .35$

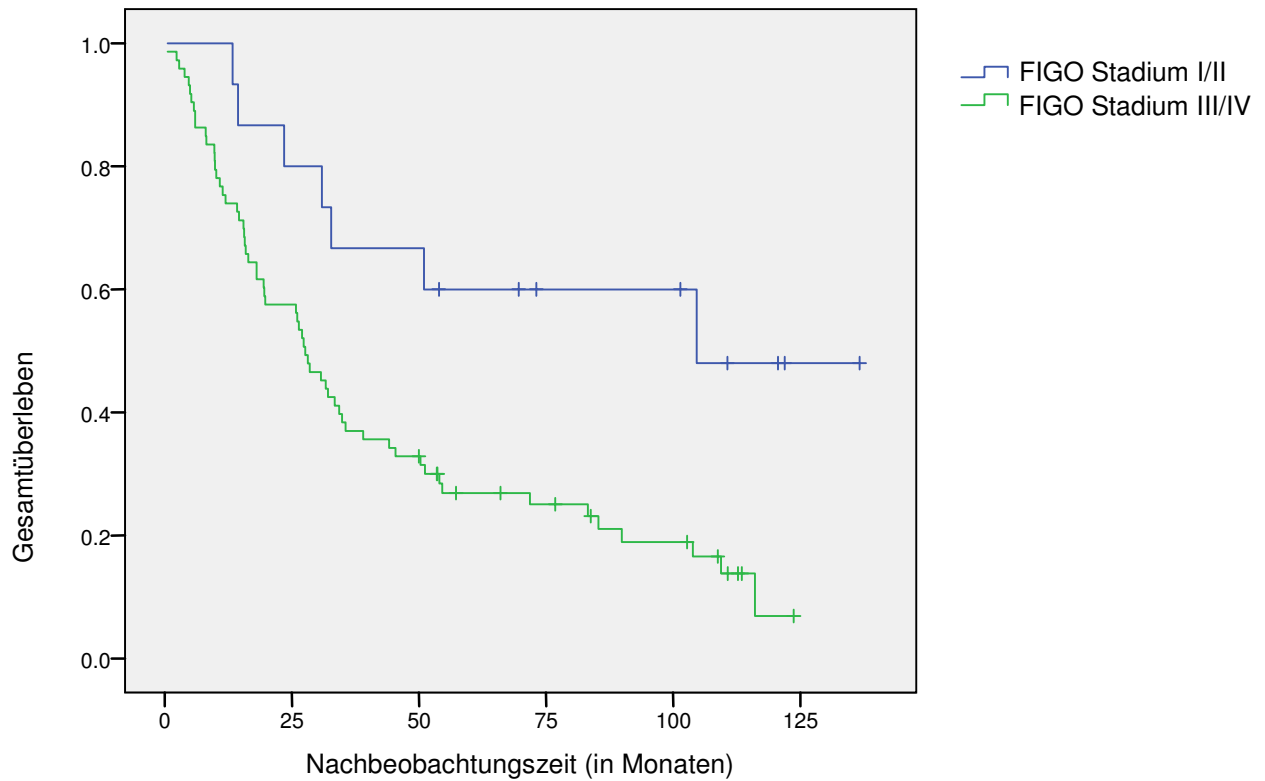
#### 4.5.3.1d. Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den klassischen prognostischen Faktoren

Die univariate Analyse der Ergebnisse wies eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Gesamtüberlebenszeit und klassischen prognostischen Faktoren nach, wie fortgeschrittenes FIGO-Stadium, Lymphknotenbefall, hohes Grading, makroskopischer Tumorrest, die Anwesenheit von Aszites und Peritonealkarzinose (s. Abbildung 8 und 9). Keine signifikante Korrelation konnte zwischen den Patientenkollektiven mit beziehungsweise ohne Lymphangiome und Hämangiome festgestellt werden (s. Tabelle 27).

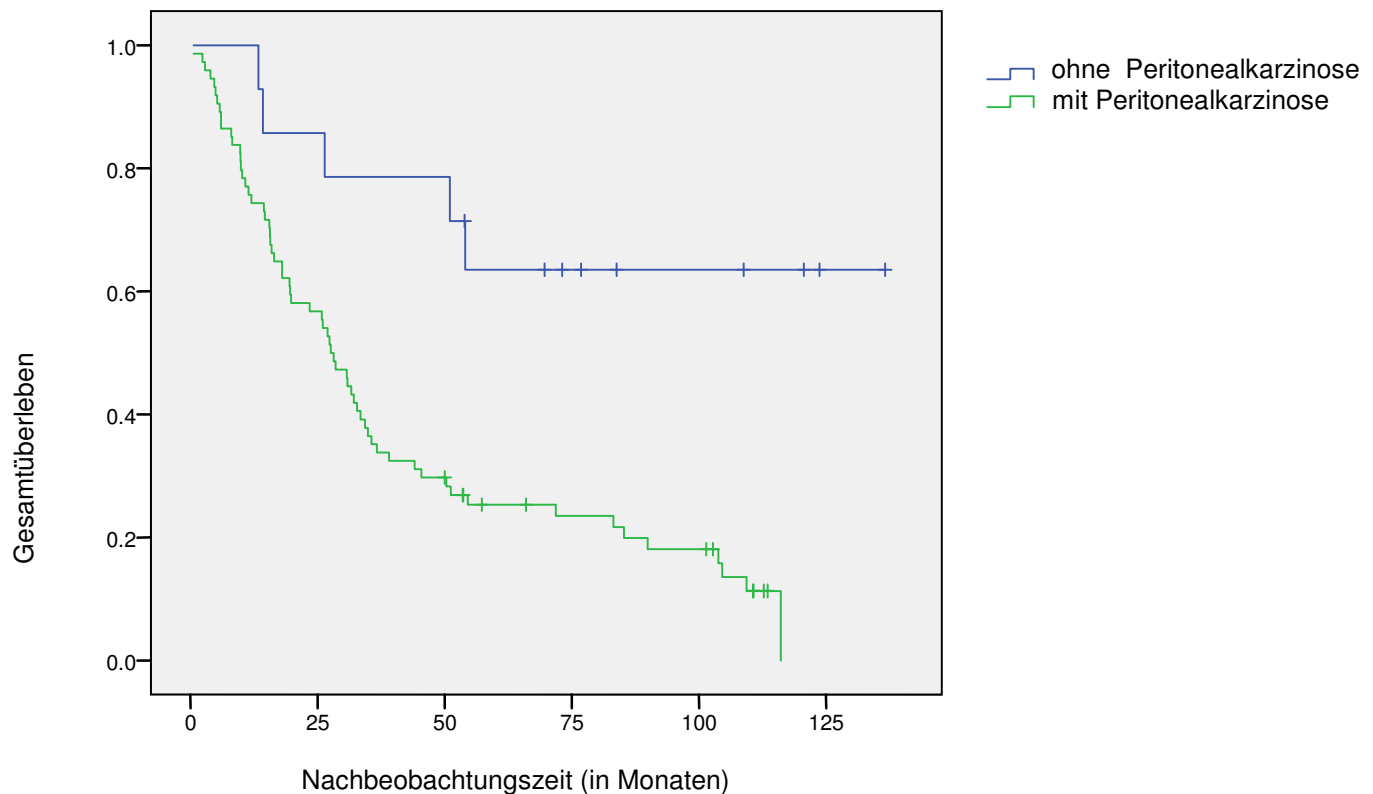


Variable	Log Rank p
FIGO Stadium (n = 88) I/ II vs III/ IV	.006
Nodalstatus (n = 38) pN <sub>0</sub> vs pN <sub>1</sub>	.016
Grading (n = 84) G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> vs G <sub>3</sub>	.005
Tumorrest (n = 62) mikro- vs makroskopisch	<.001
Aszites (n = 89) ja/ nein	.01
Peritonealkarzinose (n = 88) ja/nein	.001
Lymphangiiose (n = 87) ja/nein	.95
Hämangiiose (n = 89) ja/nein	.52

**Tabelle 27.** Univariate Analyse nach Kaplan-Meier für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von einigen klassischen prognostischen Faktoren



**Abbildung 20.** Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium. Log Rank  $p = .006$



**Abbildung 21.** Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der Anwesenheit einer Peritonealkarzinose. Log Rank  $p = .001$

Die Analyse der Patientinnen im Bezug auf das Gesamtüberleben und die verschiedenen prognostischen Faktoren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ergaben: 60 Patientinnen (88,2%) von 68 an der Ovarialkarzinomerkkrankung gestorbenen Patientinnen hatten ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium, beziehungsweise 18 (78,3%) von 23 hatten einen Lymphknotenbefall, 39 (86,7%) von 45 hatten ein hohes Grading, 22 (91,7%) von 24 hatten einen makroskopischen Tumorrest, 46 (86,8%) von 53 hatten Aszites, 63 (85,1%) von 74 hatten eine Peritonealkarzinose, 8 (80,0%) von 10 hatten eine Hämangiose und 20 (74,1%) von 27 hatten eine Lymphangiose. Bei der Primärdiagnose hatten 13 Patientinnen (61,9%) von 21 noch lebenden Patientinnen ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium, beziehungsweise 5 (21,7%) von 23 einen Lymphknotenbefall, 6 (13,3%) von 45 ein hohes Grading, 7 (13,2%) von 53

Aszites, 11 (14,9%) von 74 hatten eine Peritonealkarzinose, 5 (50,0%) von 10 eine Hämangiose und 7 (25,9%) von 27 hatten eine Lymphangiose. Von den Patientinnen, die bei der Primärdiagnose einen makroskopischen Tumorrest hatten, sind alle verstorben.

#### 4.5.3.2. Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die klassischen Prognoseparameter, Grading ( $p = .025$ ), postoperativer Tumorrest ( $p = .007$ ) und Peritonealkarzinose ( $p = .010$ ) als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben stehen (s. Tabelle 28).

Variable	Patientenzahl	RR*	95 % CI**		p***
			Untere	Obere	
FIGO Stadium I /II vs III/ IV	15/ 88 vs 73/ 88	0.774	0.189	3.175	0.722
Lymphknotenmetastasen pN <sub>0</sub> vs pN <sub>1</sub>	15/ 38 vs 23/ 38	0.972	0.189	4.991	0.973
Grading G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> vs G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub>	39/ 84 vs 45/ 84	2.035	1.092	3.793	0.025
Postoperativer Tumorrest mikro- vs makroskopisch	38/ 62 vs 24/ 62	2.438	1.282	4.637	0.007
Aszites nein; ja	36/ 89; 53/ 89	2.336	0.719	7.588	0.158
Peritonealkarzinose nein; ja	14/ 88; 74/ 88	6.740	1.567	28.997	0.010
Lymphangiose nein; ja	60/ 87; 27/ 87	0.392	0.106	1.444	0.159
Hämangiose nein; ja	79/ 89; 10/ 89	14.441	0.318	656.461	0.170
Knochenmarkstatus CK neg; CK pos	70/ 89; 19/ 89	0.377	0.066	2.164	0.274
HER-2/neu IHC neg; pos	64/ 89; 25/ 89	0.972	0.295	3.198	0.963
HER-2/neu FISH neg; pos	80/ 89; 9/ 89	0.490	0.023	10.244	0.646

\* - Relatives Risiko; \*\* - Konfidenzintervall; \*\*\* - Cox Regression

**Tabelle 28.** Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen. Bei dieser Analyse stellte sich heraus, dass der Knochenmark- und HER-2/neu-Status nicht als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben stehen.

## **5. Diskussion**

Die Ermittlung von molekularbiologischen Faktoren, die mit dem Ovarialkarzinom assoziiert sind, kann für die Beurteilung der Prognose und die Wahl der optimalen Therapie der Patienten sehr hilfreich sein. In dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark und der HER-2/neu Proteinexpressions- und Genamplifikationsrate in Ovarialkarzinomzellen untersucht.

### **5.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms**

Dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark kommt eine zunehmende klinische Bedeutung zu, da als Hauptursache für eine folgende Fernmetastasierung die hämatogene Streuung einzelner Tumorzellen angesehen wird [214]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark vor dem Auftreten von manifesten Fernmetastasen und Rezidiven untersucht.

Zahlreiche Studien, die Patienten mit oder ohne Nachweis eines manifesten Tumors erfassen zeigten, dass monoklonale Antikörper gegen Cytokeratine (wesentliche Bestandteile des Epithelzytoskeletts) als empfindliche und spezifische Parameter für den Nachweis von einzelnen Tumorzellen im Knochenmark dienen können [137, 208]. Da die Ovarialkarzinomzellen unter anderem die häufigsten Keratine des Menschen (CK8, CK18, CK19) exprimieren, haben wir den monoklonalen Antikörper A45-B/B3, der gegen diese Cytokeratine gerichtet ist, für die Identifikation von Ovarialtumorzellen im Knochenmark verwendet [215].

Um eine hohe Vergleichspräzision gewährleisten zu können, wurden etablierte Immuntests benutzt, die eng an die aktuellen Empfehlungen der Kommission für Tumorzellnachweis der internationalen Gesellschaft für Hämatotherapie und Transplantationstechnik (Tumor Cell Detection Committee of the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) angelehnt sind [215].

In dieser Arbeit wurden bei 19 (21,3 %) von 89 der Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Dieser Prozentanteil unterscheidet sich von den Angaben in der Literatur. Braun et al. [136] detektierten bei 30 %, Ross et al.

[216] bei 43 % und Cain et al. [217] bei 23 % und Fehm et al. [218] bei 36 % der Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark. Hierbei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark in zwei der genannten Arbeiten mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Korrelation zwischen dem Knochenmarkstatus und den konventionellen Prognoseparametern, wie FIGO-Stadium, Grading, postoperativem Tumorrest, Aszites, Peritonealkarzinose, Hämangiose und Lymphangiose. Es stellte sich sogar heraus, dass der Prozentsatz der Patientinnen mit CK positiven Zellen im Knochenmark und ohne Lymphknotenmetastasen (46,7 %) signifikant höher war ( $p = 0,02$ ) als jener von Patientinnen mit CK positiven Zellen im Knochenmark und Lymphknotenmetastasen (13,0 %) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und der mittels IHC und FISH bestimmten HER-2/neu Positivität in den Ovarialkarzinomzellen gefunden. Die prognostische Bedeutung dieser Faktoren ist umstritten und wurde deshalb in dieser Arbeit erforscht.

Auch in drei anderen Studien wurde keine signifikante Assoziation eines positiven Knochenmarkstatus mit einer schlechteren Prognose für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom beschrieben [216-218]. In einer dieser Studien wurden 22 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen überwiegend Stadium FIGO III und IV untersucht, nachdem sie mindestens einen Zyklus Induktionstherapie abgeschlossen und bevor sie eine Hochdosistherapie begonnen hatten [217]. Die Teilnehmerinnen der zweiten Studie waren ebenfalls Patientinnen ( $n = 42$ ) mit Tumoren Stadium FIGO III/IV oder mit Rezidiv [218]. In dieser Studie wurde die Prognose der Patientinnen durch das lokal fortgeschrittene Karzinom bestimmt, so dass der Knochenmarkstatus keinen statistisch signifikanten Einfluss mehr auf die Prognose ausüben konnte. Somit scheint der limitierende Effekt der Fernmetastasen maskiert zu werden.

Im Jahr 2001 wurde eine umfangreiche Studie der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der LMU München gemeinsam mit der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf publiziert [136]. Diese Studie untersuchte 108 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom im Stadium FIGO I-III. Bei 32 Patientinnen (30%) wurden Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Der Nachweis von CK positiven Zellen zeigte

keinen Bezug zu den bewährten Risikoparametern, bis auf den niedrigen histologischen Differenzierungsgrad des Primärtumors. Die Datenlage konnte im Jahr 2007 durch eine weitere Studie der Universitäts-Frauenklinik Maistraße der LMU München ergänzt werden, die eine signifikante Korrelation zwischen der Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und einem kürzeren metastasenfreien Überleben zeigt [219].

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist das Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit dem Auftreten von Rezidiven (Log Rank  $p = 0,52$ ), Fernmetastasen (Log Rank  $p = 0,87$ ) oder tumorassoziertem Tod der Patientinnen (Log Rank  $p = 0,81$ ) nicht signifikant vergesellschaftet. Von den 24 Patientinnen mit Metastasen, hatten 5 (20,8%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark. Von den 65 metastasenfreien Patientinnen hatten 14 (21,5%) einen positiven Knochenmarkbefund. 5 von 19 KM positiven Patientinnen (26,3%) entwickelten Fernmetastasen, aber nur 19 von 70 KM negativen Patientinnen (27,1 %).

Dies bestätigt die Ergebnisse von Braun et al. [136], die während einer Nachbeobachtungszeit von 45 Monaten fanden, dass die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit dem Auftreten von extra-peritonealen (vorwiegend außerhalb des Skeletts) Fernmetastasen (Log Rank  $p < 0,0001$ ) und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit aufgrund der Ovarialkarzinomkrankung (Log Rank  $p = 0,01$ ) signifikant korreliert. In der multivariaten Analyse der metastasenfreien Überlebenszeit bestätigte sich der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger prognostischer Parameter.

Die zum Teil bestehende Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Publikation von Braun et al. [136] im Journal of Clinical Oncology, sowie der anderen drei zitierten Studien von Ross et al. [216] und Cain et al. [217] und Fehm et al. [218] könnte durch eine Reihe von Unterschieden in der Methodik und Auswertung erklärt werden. Durch die Untersuchung der Primärtumore auf HER-2/neu ist es gegenüber dem Kollektiv von Braun et al. zu einer Patientinnenselektion gekommen, da nicht alle Primärtumore für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung standen. Zum Teil ging Tumorgewebe verloren, da das Anfertigen neuer Schnitte aus den alten Paraffinblöcken nicht möglich war, andererseits wurden Primärtumorschnitte durch den Andauungsprozess zerstört.

Des Weiteren lagen nicht für alle Patientinnen in dieser Arbeit die Tumorcharakteristika vor, was zu einer unzureichenden Patientenanzahl zur Bestimmung der Korrelation mit diesen Faktoren führt.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit der Patientinnen in dieser Arbeit (62,5 Monate) ist länger als die in der Studie von Braun et al. (45 Monate). Da die Prognose für die Patientinnen mit Ovarialkarzinom insgesamt schlecht ist (5-Jahreüberlebensrate 30-40%) [220], könnte vermutet werden, dass mit zunehmender Nachbeobachtungszeit die prognostische Relevanz der untersuchten Faktoren (z. B. hier die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark) niedriger wird. Die meisten Patientinnen mit Ovarialkarzinom versterben an lokoregionären Komplikationen, wie Ileus, Aszites, oder Tumorkachexie, so dass eine Fernmetastasierung klinisch häufig okkult bleibt und nicht zum Tod der Patientin führt. Dementsprechend sind auch der postoperative Tumorrest, Aszites oder Peritonealkarzinose weiterhin die wichtigsten Prognosefaktoren für das Outcome der Patientinnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die keine signifikante prognostische Relevanz der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Ovarialkarzinompatientinnen zeigen, sind deshalb unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Störfaktoren zu interpretieren.

## **5.2. HER-2/neu**

### **5.2.1. Her-2/neu Proteinexpression**

Die HER-2/neu Proteinexpressionsrate von 2+ und 3+ in der vorliegenden Arbeit betrug 27,8 %. Diese Zahlen stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein.

Nach aktuellen Richtlinien zur Bestimmung der Proteinexpression beim Mammakarzinom wird mittlerweile eine HER-2/neu Proteinüberexpression nur noch als IHC 3+ definiert [221]. Da für die Beurteilung der HER-2/neu Expression beim Ovarialkarzinom bislang jedoch keine solchen Richtlinien existieren, wurden in der vorliegenden Arbeit IHC Ergebnisse von 2+ und 3+, als positiv gewertet.

Die Überexpression von HER-2/neu wurde in den meisten Studien bei Mammakarzinomen erforscht. In 15-30% der primären Mammakarzinome wurde eine



Überexpression von HER-2/neu beobachtet [45, 221-223] und war mit aggressivem Potential und schlechter Prognose assoziiert [45, 222, 224-227].

Im Gegensatz zum Mammakarzinom liegen bis heute weniger Angaben über das HER-2/neu Überexpressionsmodell im Ovarialkarzinom vor. Darüber hinaus sind die vorhandenen Daten widersprüchlich und basieren oft auf kleinen Patientenstichproben. In den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Färbungen und Auswertungsprogramme verwendet. Die Überexpressionsrate von HER-2/neu schwankt in den verschiedenen Studien in einem weiten Bereich zwischen 0% und 30% [3, 45, 170, 196, 228-236]. Mehrere Studien zeigten zu der Zeit der primären Diagnose von Epithelovarialkarzinomen, nach Platinhaltiger Chemotherapie, sowie beim Rezidiv einen niedrigen Grad der HER-2/neu Überexpression zwischen 2% und 11% [228]. Aktuell publizierte Studien aus Frankreich (320 Patientinnen) [237] und Dänemark (160 Patientinnen) [238] fanden eine IHC HER-2/neu Proteinexpression von 2+ und 3+ in 12,8%, beziehungsweise 11,3% der Ovarialkarzinome.

Die Expression des HER-2/neu Rezeptors wird immunhistochemisch erfasst. Mehrere Antikörper erkennen spezifisch das HER-2/neu-Protein [239-242]. Benutzt werden monoklonale Antikörper wie 9G6 (Oncogene Science, Calbiochem-Novabiochem, Deutschland), 3B5 (Oncogene Science, Calbiochem-Novabiochem, Deutschland), CB11 (Novocastra, Newcastle, United Kingdom), TAB 250 (Digest All; Zymed Lab Inc, South San Francisco, CA), GSF-HER2 (Dr. Lindhofer, Institut für Immunologie der GSF, München, Deutschland) und polyklonale Antikörper wie A8010 (Oncor), A0485 (DACO, Glostrup, Dänemark), Hercep-Antikörper (DACO, Glostrup, Dänemark). Um widersprüchliche Ergebnisse zwischen den verschiedenen Laboratorien zu vermeiden, wird die Verwendung von HerceptTest empfohlen, der 1997 von FDA als diagnostischer Standardkit für den immunhistologischen Nachweis von HER-2/neu, in Kombination mit zugehörigen Kontrollen, anerkannt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HER-2/neu Proteinfärbung mit dem FDA-zugelassenen HerceptTest (Hersteller Firma DAKO in Zusammenarbeit mit Genentech), der auf polyklonalen Anti-HER-2/neu-Antikörpern basiert, auf Paraffinschnitten von formalinfixiertem Tumorgewebe durchgeführt. Der Grad der immunhistochemischen HER-2/neu Rezeptorfärbung wurde durch einen erfahrenen Pathologen ausgewertet.

Eine HER-2/neu IHC 2+/3+ Proteinexpression fand sich ohne einen signifikanten Unterschied in allen FIGO-Stadien ( $p = 0,16$ ), bei gut- und schlecht differenzierten Tumoren ( $p = 0,30$ ) und korrelierte nicht mit Patienten- und Tumorcharakteristika wie Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,80$ ), Tumorrest ( $p = 0,89$ ), Aszites ( $p = 0,67$ ), Peritonealkarzinose ( $p = 0,51$ ), Lymphangiome ( $p = 0,78$ ) und Hämangiome ( $p = 0,37$ ). Widersprüchlich sind die Studienergebnisse, die den Zusammenhang zwischen HER-2/neu Überexpression und FIGO-Stadien, Tumorhistologie, Tumorgrading etc. in Ovarialkarzinomen beschreiben. Manche Forschungskollektive fanden eine höhere HER-2/neu Überexpressionsrate in den Zellen bei fortgeschrittenen FIGO-Stadien [4, 170]. Diese Korrelation aber ist von anderen Studien, so wie in der vorliegenden Arbeit, in Frage gestellt worden [3, 62, 81, 147]. Die Untersuchungen von Felip et al. [143] zeigten, dass Ovarialkarzinome mit einer höheren HER-2/neu Überexpressionsrate häufiger ein FIGO-Stadium III/IV ( $p = 0,057$ ), so wie einen Tumorrest  $> 2\text{cm}$  ( $p = 0,01$ ) hatten und nicht auf Chemotherapie ansprachen ( $p = 0,0043$ ). Meden et al. [145] fanden, dass die HER-2/neu-Überexpression einen statistisch signifikanten negativen prognostischen Effekt bei Patientinnen in frühen Stadien eines Ovarialkarzinoms hat, aber Leeson et al. [244] und Tomic et al. [245] stellten mit ihren Studienergebnissen das Gegenteil fest.

Riener et al. [170] berichten in ihrer multizentrischen Studie, dass die HER-2/neu-Überexpression bei Frauen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomstadien selten ist und keine zusätzliche prognostische Information zu den bewährten klinisch-pathologischen Parametern liefert.

Die immunhistochemische Analyse von Skirnisdottir et al. [62], der „MALOVA“ Ovarialkarzinomstudie [3], Tanabe et al. [147] und Riener et al. [170] zeigten außerdem keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der HER-2/neu Expression und dem Tumorgrad, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, der Residualtumorgröße und dem Alter der Patientinnen. Leng et al. untersuchten die Tumorschnitte von 28 Patientinnen mit einem endometroiden Ovarialkarzinom und stellten fest, dass die HER-2/neu Überexpressionsrate höher war bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium und einem Resttumor nach Initialoperation.

Eltabbachi et al. [245] und Heinrich et al. [246] beobachteten, dass HER-2/neu bei Borderline Tumoren häufiger in den fortgeschrittenen Stadien überexprimiert war und somit eine prognostische Aussage zur Tumorprogression zu haben scheint.

Für Kupryjanczuk et al. [247] spielt der p53-Status eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der prognostischen Bedeutung der HER-2/neu-Überexpression. Sie berichten von einem höheren Rezidivrisiko, einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie und damit einer kürzeren Überlebenszeit für Patientinnen mit HER-2/neu überexprimierten Ovarialkarzinomen bei Vorhandensein von p53-Mutationen.

Beim Erforschen der prediktiven Rolle von HER-2/neu und der Cyclooxygenase 2 in der Prognose der Ovarialkarzinome konnten aktuell Steffensen et al. [238] eine signifikante Korrelation zwischen der HER-2/neu Überexpression und dem FIGO-Stadium, dem Tumorgrad und dem histopathologischen Tumortyp feststellen.

In der vorliegenden Arbeit waren 84 % der Ovarialkarzinome mit einer HER-2/neu IHC 2+/3+ Proteinexpression serös-papillär, 8% Adenokarzinome ohne weitere Histologieangaben und 4 % Klarzellkarzinome. Weitere Angaben zum Zusammenhang zwischen dem immunhistochemisch nachgewiesenen HER-2/neu Status und dem Histologietypus des Ovarialkarzinoms sind in der Literatur zu finden. Wu et al. [248] fanden selten eine HER-2/neu Amplifikation und Überexpression in Ovarialkarzinomen verschiedener Histologietypen in frühen Stadien. Am höchsten waren sie in den serösen Tumoren. Eine hohe HER-2/neu Überexpressionsrate in serösen Ovarialkarzinomen haben auch Skirnisdottir et al. [62] und Hogdall et al. [3] beschrieben.

Keine Verbindung zwischen HER-2/neu Überexpression und Histologietyp des Ovarialkarzinoms fanden Tanabe et al. [147], Hogdall et al. [3], sowie Riener et al. [170]. Iwamoto et al. [249] und Skirnisdottir et al. [62] beschreiben eine niedrige und Wu et al. [248] keine HER-2/neu Überexpression im Klarzellkarzinom des Ovars. Im Gegensatz dazu berichtet die „MALOVA“ Ovarialkarzinomstudie [3] über hohe HER-2/neu Expressionsraten in Klarzellkarzinomen. Der Grund für diese Unterschiede ist nicht bekannt. In muzinösen Ovarialkarzinomen zeigten die Ergebnisse von Ferrandina et al. [250] keine HER-2/neu Überexpression, im Gegensatz zu zwei anderen Forschungsgruppen, die eine hohe Expressionsrate dieses Proteins im selben Tumortyp schilderten [3] und [62]. Reine primär muzinöse Ovarialtumoren sind jedoch wesentlich weniger häufig. Die meisten von diesen stellen Fernmetastasen anderer Tumoren dar [251]. Es ist möglich, dass die muzinösen Tumoren eine Mischung von Karzinomen ovarialen Ursprungs und Metastasen waren. Dies könnte zu den diskrepanten Ergebnissen geführt haben.

Wang et al. [252] und Gao et al. [253] haben über eine niedrige HER-2/neu Überexpression in Borderline Ovarialtumoren berichtet.

Eine höhere HER-2/neu Überexpressionsrate zeigen auch aus malignem Aszites gewonnene Ovarialkarzinomzellen [231].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass die Patientinnen mit einer HER-2/neu Rezeptorpositivität signifikant häufiger Rezidive bekamen (Log Rank  $p = 0,02$ ). Die IHC 2+/3+ Expression von HER-2/neu hatte aber keinen Einfluss auf die Entwicklung von Metastasen (Log Rank  $p = 0,66$ ) und auf das Gesamtüberleben (Log Rank  $p = 0,32$ ) der Ovarialkarzinompatientinnen. In der multivariaten Analyse erwies sich die HER-2/neu Positivität als ein unabhängiger prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen ( $p = 0,001$ ).

In den letzten Jahren haben eine Reihe von Untersuchungen die prognostische Relevanz der HER-2/neu Proteinüberexpression in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen. Berchuck et al. [144] fanden in ihrer Studie von 73 Ovarialkarzinompatientinnen (mittels immunhistochemischer Technik an frisch gefrorenem Gewebe), dass die positive HER-2 Färbung signifikant ( $p = 0,001$ ) mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert war. Diese Assoziation wurde ebenfalls in den Studien von Slamon et al. [45] für 72 Patientinnen mit epithelialen Ovarialtumoren, Leng et al. [142], sowie Felip et al. [143] beschrieben.

Weitere zwei Studien aus Dänemark und Frankreich fanden, dass HER-2/neu in 13%, beziehungsweise 16% der Ovarialkarzinome überexprimiert war und positiv mit der erkrankungsfreien und der Gesamtüberlebenszeit korreliert [3, 235]. Ähnlich berichteten Kacinski et al. [254], dass ein großer Teil der Ovarialkarzinompatientinnen, deren Tumore eine starke Membrananfärbung für HER-2/neu zeigten, innerhalb von 3 - 4 Jahren Rezidive erlitten. Diese Assoziation von der HER2/neu Überexpression mit einer biologischen Aggressivität (Rezidive, Metastasen) des Ovarialkarzinoms wurde auch von Gao et al. [253] beschrieben.

Im Gegensatz dazu fanden Arbeitsgruppen wie Rubin et al. [229, 230], van der Zee et al. [255], Scambia et al. [256], Ross et al. [257], Medl et al. [258], Singleton et al. [259], Skirnisdottir et al. [62], Mano et al. [260], Frutoso et al. [261], Young et al. [262], Ferrandina et al. [263] sowie die neu publizierte Studie von Riener et al. [170], dass die HER-2/neu- Überexpression und/oder Amplifikation keinen prädiktiven Wert für die Überlebenszeit der Patientinnen mit Ovarialkarzinom darstellt.

Nach Haldane et al. [264] ist die HER-2/neu Überexpression sogar positiv mit einem längeren Überleben korreliert.

Fajac et al. [146] und Tanner et al. [265] berichten von einer Korrelation zwischen der HER-2/neu Überexpression und der Überlebenszeit in der univariaten, aber nicht in der multivariaten Analyse. Hogdal et al. [3] konnten die prognostische Relevanz einer HER-2/neu Überexpression in den beiden Analysen nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden die Studien von Hornung et al. [99] sowohl in den uni- als auch in den multivariaten Analysen keine Korrelation zwischen den oben beschriebenen Faktoren.

Bei der Beurteilung des prognostischen Effekts von HER-2/neu mittels univariater Analyse fanden Nielsen et al. [266], dass eine Überexpression bei epithelialen Ovarialtumoren mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate verbunden ist. In derselben Analyse bestand für die Borderline Tumoren keine Korrelation der HER-2/neu Überexpression mit der Überlebenszeit. Die multivariate Analyse zeigte, dass HER-2/neu in epithelialen Ovarialtumoren das Mortalitätsrisiko abhängig vom Tumorstadium signifikant erhöht, und in Borderline Tumoren die Prognose abhängig vom Alter verbessert.

Jedoch lieferten auch zwei Studien aus dem Jahre 2007 widersprüchliche Ergebnisse: Tuefferd et al. [237] fanden keine prognostische Bedeutung der HER-2/neu Expression (bestimmt mittels IHC) bezüglich des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens und Steffensen et al. [238] stellten eine signifikant längere Überlebenszeit für Patientinnen mit negativem immunhistochemischen Status für HER-2/neu (IHC 0) fest. Allerdings zeigte sich in der zuletzt genannten Studie kein ersichtlicher Unterschied im Bezug auf das Überleben unter den Patientinnen mit HER-2/neu IHC 1+, IHC 2+ und IHC 3+.

Die Gründe für die Unterschiede des prognostischen Werts von HER-2/neu in der vorliegenden Arbeit und in den verschiedenen Studien liegen zum Teil darin, dass unterschiedliche Methoden zur Bestimmung benutzt wurden. Andere wichtige Faktoren sind die Variationen in den histologischen Subtypen, die unterschiedlichen Therapiemodalitäten, das Alter und das Stadium bei Diagnosestellung, die Dauer des Follow-up und die verschiedenen zusätzlichen Prognosefaktoren, die in den multivariaten Modellen analysiert wurden [269, 270]. Ein weiterer wichtiger Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt darin, dass in der vorliegenden Dissertation

eine immunhistochemische HER-2/neu Färbung von 2+ und 3+ und in aktuelleren Arbeiten nur von 3+ als HER-2/neu Proteinüberexpression bewertet wurde.

Würde man die neuen Leitlinien zur Bestimmung einer HER-2/neu Überexpression, wie sie für das Mammakarzinom erarbeitet wurden, für die vorliegende Arbeit anwenden, würde sich die HER-2/neu Überexpressionsrate auf 6,7% verringern.

Desweiteren ließe sich keine signifikante Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben nachweisen.

### **5.2.2. HER-2/neu Genamplifikation**

In dieser Arbeit wurde eine HER-2/neu Genamplifikationsrate  $> 2$  bei 9 (10,1 %) von 89 Patientinnen mittels FISH ermittelt. Im Vergleich zu mehreren Studien befindet sich diese Prozentzahl im Variationsbereich. In der bisherigen Literatur variiert der Anteil der durch FISH ermittelten erbB-2 Amplifikationsrate bei Ovarialtumoren zwischen 6 % und 35 % [140, 141, 236-238, 257, 262, 269]. Die durch andere Methoden als FISH bestimmten erbB-2 Amplifikationsraten (z. B. Southern blotting, quantitative/ Differential- PCR (=engl. Polymerase Chain Reaction), schwanken zwischen 20 % und 30 % [45, 270-272]. Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse ist schwierig, nicht nur wegen der unterschiedlichen Methoden, sondern auch wegen der unterschiedlichen Definition der Amplifikationsrate.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hat sich als eine gute Methode zur Bestimmung der erbB-2 Genamplifikation erwiesen [273]. Die PCR hat z.B. den Nachteil, unter dem Verdünnungseffekt nichtneoplastischer Komponenten im Gewebe zu leiden und benötigt häufig eine Mikrodisektion der Tumorzellen für die akkurate Analyse [274]. Für die FISH-Methode wurden auch verschiedene Kits entwickelt, von denen die von der FDA (Food and Drug Administration, USA) anerkannten zu empfehlen sind. Hauptsächlich kann die FISH an isolierten Zellkernen von in Paraffin eingebetteten Proben oder an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser zwei Techniken erwiesen sich als übereinstimmend [275]. Vorherige Studien haben die Genamplifikation an zytologischen Präparaten [276-278], sowie an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten [279-281] untersucht.

Die HER-2/neu Genamplifikationsrate in der vorliegenden Arbeit wurde mittels FISH an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten bestimmt. Das dafür verwendete

standardisierte PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit der Firma Vysis wurde von der FDA zur Untersuchung des HER-2/neu Genstatus bei Ovarial- und Brustkarzinomen freigegeben. Es basiert auf der Dual-color-FISH-Technik mit zwei verschiedenfarbig markierten Sonden zur Detektion zweier Chromosomenabschnitte. Dies ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung der Anzahl der HER-2/neu Genkopien und der Anzahl des Chromosoms 17 mittels Centromeranfärbung durch Auszählen der fluoreszierenden Sonden signale. Eine HER-2/neu Genamplifikation liegt hier bei einem HER-2/neu / CEP 17-Ratio  $\geq 2$  vor, wobei Ergebnisse zwischen 1,8 und 2,2 mit Vorsicht zu interpretieren sind [282, 283].

Eine erhöhte Zahl an HER-2/neu Genkopien zeigte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Korrelation mit der bei der Primärdiagnose nachgewiesenen Tumorzellinvasion der Blutgefäße ( $p = 0,03$ ). Es wurde keine Assoziation der HER-2/neu Genamplifikation mit den anderen untersuchten Prognoseparametern gefunden, wobei die Signifikanz für die Korrelation mit der Lymphangiogenese ( $p = 0,09$ ) als Grenzwert interpretiert werden kann.

Ebenfalls zeigen aktuell publizierte Daten von Tuefferd et al. keine Korrelation zwischen dem HER-2/neu Status in Ovarialtumoren und den klassischen prognostischen Faktoren (Tumorstadium, Histologietyp, Tumorgrad, Aszites, Debulking-Status, Alter) [237].

Die prognostische Bedeutung der HER-2/neu Genamplifikation in Ovarialtumoren wurde in einer umfassenden Studie von Lassus et al. beschrieben [81]. In dieser Studie wurde die HER-2/neu Genamplifikationsrate in den Gewebsschnitten von 401 Patientinnen mit serösen Ovarialkarzinomen mittels CISH (=engl. Chromogenic in situ hybridisation) untersucht. Die CISH Methode wird als eine gute Alternative zur FISH für diesen Nachweis angesehen [284]. Eine erhöhte Zahl an HER-2/neu Genkopien war mit einem hohen Grading ( $p < 0,0001$ ), einem hohen Patientenalter ( $p = 0,010$ ) und einem großen postoperativen Tumorrest ( $p = 0,014$ ), nicht aber mit dem FIGO-Stadium ( $p = 0,29$ ) und dem Vorhandensein von Aszites ( $p = 0,19$ ) assoziiert. Afify et al. konnten bei der Analyse von 23 papillär-serösen Ovarialtumoren eine signifikante ( $p = 0,036$ ) Korrelation zwischen der mittels FISH nachgewiesenen HER-2/neu Amplifikation und den FIGO-Stadien nachweisen. In der Studie von Seki et al. [140] korrelierte der HER-2/neu Status mit bestimmten Histologietypen, dem Grading und dem CA 125 Serumspiegel. Yang et al. [141]

fanden mittels Southern blot Analyse eine starke Korrelation zwischen der HER-2/neu Amplifikation und dem FIGO-Stadium ( $p = 0,026$ ), dem Zelldifferenzierungsgrad ( $p = 0,011$ ) und der Tumorrestgröße ( $p < 0,001$ ).

Die HER-2/neu Genamplifikationsrate in der vorliegenden Arbeit zeigte in der univariaten Analyse keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven (Log Rank  $p = 0,26$ ) und mit der Überlebensdauer (Log Rank  $p = 0,38$ ) der Ovarialkarzinompatientinnen. Signifikant kürzer erwies sich die metastasenfreie Zeit für Patientinnen mit HER-2/neu-Gen amplifizierten Ovarialkarzinomen ( $p = 0,02$ ). Allerdings zeigte sich die HER-2/neu Genamplifikation nicht als unabhängiger Prognostischer Faktor in den multivariaten Analysen.

In ihrer Studie fanden Lassus et al. [81] heraus, dass die Anzahl von HER-2/neu Genkopien eine prognostische Bedeutung bei Patientinnen mit serösen Ovarialkarzinomen hat. Die erhöhte HER-2/neu Genkopienzahl war mit einem schlechteren Therapieansprechen ( $p = 0,024$ ), einer höheren Rezidivrate ( $p < 0,0001$ ) und einer kürzeren Überlebenszeit ( $p < 0,0001$ ) assoziiert. Außerdem hing eine ungünstigere Prognose von dem Grad der HER-2/neu Genamplifikation (3-5 versus 5 Genkopien) ab. In der multivariaten Analyse für das Gesamtüberleben erwies sich die HER-2/neu Genkopienanzahl als ein unabhängiger prognostischer Faktor. Andere Studien haben ebenfalls den prognostischen Wert von der HER-2/neu Genamplifikationsrate in Ovarialkarzinomen zusammen mit den klinisch-pathologischen Tumorcharakteristika evaluiert. Die Studie von Fajac et al. [146], in der 65 Ovarialkarzinome mittels Southern blot analysiert wurden und in 14 % davon eine erhöhte HER-2/neu Genamplifikation nachgewiesen wurde, berichtete von einer Assoziation der HER-2/neu Genamplifikation mit einer kürzeren Überlebenszeit in der univariaten, nicht aber in der multivariaten Analyse. Ebenfalls auf einer Southern Blot Analyse basieren die Ergebnisse von Yang et al. [141], die die HER-2/neu Genamplifikation als einen unabhängigen prognostischen Parameter für Patientinnen mit einem primären epithelialen Ovarialkarzinom beschreiben. Die Publikation von Medl et al. [258], die bei 196 untersuchten Ovarialkarzinomen eine mittels PCR bestimmte hohe HER-2/neu Amplifikationsfrequenz (40 %) beschrieben, fanden keine Korrelation zwischen der HER-2/neu Genamplifikation und der Überlebenszeit der Patientinnen. Seki et al. [140] konnten keine Korrelation zwischen der HER-2/neu Genamplifikation und der Überlebenszeit der Patientinnen nachweisen.



Der Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den beschriebenen Studien liegt wahrscheinlich daran, dass sie sich in der Wahl der Patientenkollektive, der Nachbeobachtungszeit, den Methoden und der Auswertung unterscheiden.

Aktuellere Veröffentlichungen, in denen die HER-2/neu Genamplifikation in Ovarialkarzinomen, wie in der vorliegenden Arbeit, mittels FISH bestimmt wurde, beschreiben ebenfalls keine signifikant längere Überlebens- und/oder rezidivfreie Zeit für HER-2/neu negativen Patientinnen. Hier wurde eine Amplifikation allerdings unterschiedlich definiert (mit einer HER-2/neu/CEP 17 – Ratio  $\geq 2$  [239] oder  $\geq 2,2$  [237]). Zu beachten ist, dass nach aktuellen Richtlinien die HER-2/neu Genamplifikation mit einem HER-2/neu/CEP 17 – Ratio  $\geq 2,2$  im PathVysion<sup>TM</sup>-Kit definiert ist.

### **5.3. Korrelation der Ergebnisse der HER-2/neu Bestimmung mittels IHC und FISH**

Seit der Entdeckung des HER-2/neu Rezeptors wurde eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis dieses Proteins und seines Gens untersucht. Eine Bestimmung des HER-2/neu-Status hat sich hinsichtlich seines Einflusses auf mögliche Therapien, vor allem beim Mammakarzinom, als wichtig erwiesen.

Es gibt keine Methode zur Bestimmung von HER-2/neu, welche sich als „Gold Standard“ etabliert hat. Annähernd 20 % der derzeitigen benutzten Tests sind ungenau und fehlerhaft. Die ASCO (American Society of Clinical Oncology) und der CAP (College of American Pathologists) haben Richtlinien entwickelt, welche die Genauigkeit der HER-2/neu Bestimmung in invasiven Mammakarzinomen verbessern sollten [221]. Nach Erkenntnissen der FDA (United States Food and Drug Administration) werden auf IHC- und FISH-basierende Methoden für die Prüfung des HER-2/neu Status beim Mammakarzinom angewendet. Ein positiver HER-2/neu Test liegt dann vor, wenn entweder ein IHC Ergebnis der Proteinüberexpression von 3+ vorliegt (definiert als eine einheitlich starke Membranfärbung von mehr als 30 % der Tumorzellen) oder eine mittels FISH nachgewiesene HER-2/neu Genamplifikation mit einem Mittelwert von mehr als sechs Genkopien in einem Zellkern oder ein HER-2/neu/CEP 17 – Ratio  $\geq 2,2$ . Zweifelhaft ist der IHC-HER-2/neu-Proteinexpressionsstatus von 2+, so dass die entsprechenden Tumorproben zusätzlich auf das

Vorhandensein einer Genamplifikation überprüft werden sollten (z. B. FISH). Eine mittels FISH bestimmte HER-2/neu/CEP 17 Rate zwischen 1,8 und 2,2 ist ebenfalls zweifelhaft. Empfohlen wird die Untersuchung von zusätzlichen Zellen oder die erneute Durchführung des Tests. Ergibt sich dabei eine HER-2/neu/ CEP 17 Ratio von  $\geq 2,0$  sind diese Patientinnen für eine Transtuzumab – Therapie geeignet.

Der Vergleich zwischen IHC und FISH in Brustkarzinomzellen zeigte eine sehr gute Korrelation zwischen hohen HER-2/neu Überexpressionsraten (3+) und einer Genamplifikation. IHC Ergebnisse von 2+ zeigten jedoch in wenigen Fällen eine Genamplifikation [275, 285-288].

Es ist relativ wenig über die HER-2/neu Amplifikation und Überexpression in Ovarialkarzinomen bekannt. Die klinische Signifikanz von einer HER-2/neu Überexpression/ Amplifikation ist bei dieser Tumorentität immer noch umstritten und die in Studien angewendeten Methoden zu deren Nachweis sind nicht standardisiert. Hauptsächlich werden auch hier IHC und FISH verwendet, die in routinemäßig fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben angewendet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Signifikanz ( $p < 0,001$ ) zwischen dem immunhistochemisch und dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status nachgewiesen. Nur 11 % von den IHC 2+ und 57 % von den IHC 3+ Tumoren zeigten eine Genamplifikation im FISH Test. In der Literatur aber liefern die Arbeitsgruppen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation beider Methoden. Lassus et al. [81], Vernimmen et al. [69] und zwei aktuellere Studien von Steffensen et al. [238] und Tuefferd et al. [237] fanden eine hohe erbB-2 Amplifikationsrate in Ovarialkarzinomzellen mit hoher HER-2/neu Überexpressionsrate. Mano et al. [260], Fajac et al. [146], Morali et al. [289] und Bookman et al. [196] fanden in Ovarialkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen HER-2/neu Amplifikation und Überexpression, was zur Annahme führt, dass viele Amplifikationsfälle nicht in einer Proteinüberexpression resultieren und dass noch andere Faktoren als die Genamplifikation die HER-2/neu Proteinexpression, als Teil eines komplexen Regulationsprozesses, beeinflussen.

Der Mangel an Übereinstimmung zwischen Amplifikation und Überexpression in manchen Studien könnte an dem Gewebekblockalter und der Lagerungsdauer der ungefärbten Schnitte vor dem immunhistochemischen Test [222, 248, 280, 290]

liegen. Mano et al. [260] dagegen behaupten, dass das Blockalter keinen Einfluss auf den Nachweis der biologischen Marker bei IHC oder FISH hat. ASCO und CAP empfehlen dringend das Benutzen von standardisierten Betriebsverfahren um Fehler beim Fixieren, Lagern, Bearbeiten von Gewebeschnitten zu vermeiden [221].

Obwohl IHC und FISH zwei von der FDA anerkannte Methoden zur Bestimmung der HER-2/neu Expressions- und Amplifikationsrate sind, haben sie auch Nachteile. Einige Autoren glauben, dass die alleinige IHC Bestimmung des HER-2/neu Status weder mit klinischen und biologischen Parametern korreliert, noch mit dem durch FISH erhaltenen HER-2/neu Status [286]. Häufig auftretende Probleme bei der Immunhistochemie (IHC) sind 1) die Variabilität in den Antigenfixations- und Wiederherstellungstechniken (Formalin fixiert vs. eingefroren vs. eingefroren und dann Formalin fixiert) [45], 2) die Wahl des Primärantikörpers, 3) die Signifikanz der Kontrollfärbungen (Membran- vs. unspezifische Zytoplasmafärbungen), 4) die subjektiven Schwankungen des Auswertungssystems, 5) die Wahl des HER-2/neu Test-Kits, 6) eine unterschiedliche Dicke der Gewebeschnitte und andere [145]. Wu et al. [248] meinen, dass die IHC Ergebnisse ihrer Studie die in Wahrheit vorliegende HER-2/neu Expression höchstwahrscheinlich unterschätzen. Im Gegensatz dazu behaupten Slamon et al. [45], dass der immunhistochemische Nachweis von HER-2/neu technisch besser ist. Lebeau et al. [275] berichten sogar, dass Brustkarzinomzellen ohne erbB2 Genamplifikation eine HER-2/neu Überexpression im HercepTest aufweisen, was möglicherweise an einer höheren Sensibilität der Hercep-Antikörper auch bei geringer Überexpression liegt.

Die Ergebnisse bei der FISH variieren mit der Verwendung von verschiedenen Proben und Hybridisierungsbedingungen (Strenge des Waschvorgangs, Temperatur bei Hybridisierung, Sequenz und Länge der Oligonukleotide, Bestandteile der Markierung und andere).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den oben genannten Studien zeigt, dass beide Methoden, IHC und FISH, notwendig sind um den HER-2/neu Status in Brust- und Ovarialkarzinomen zu bestimmen. Da die Zeit für die technische Vorbereitung und für die Ergebnisinterpretation, sowie die Reagenzkosten wesentlich niedriger bei IHC im Vergleich zu FISH sind, sollte das Konzept des HER-2/neu Positivität Nachweises (IHC als Primärtest und FISH bei zweifelhafter IHC Proteinüberexpression (2+)) für Ovarialtumore ebenfalls gelten.

## **5.4. Die klassischen prognostischen Faktoren für das Ovarialkarzinom**

Um die prognostische Bedeutung von HER-2/neu und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark in der vorliegenden Arbeit zu ermitteln, wurden diese beiden Parameter mit etablierten prognostischen Faktoren korreliert. Außerdem wurde der Einfluß der klassischen Prognosefaktoren auf das rezidivfreie, metastasenfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen untersucht. In der univariaten Analyse zeigten die Ovarialkarzinompatientinnen mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium, einem Lymphknotenbefall, einem makroskopischen postoperativen Tumorrest, Präsenz von Aszites oder einer Peritonealkarzinose eine höhere Rezidivneigung. Der Differenzierungsgrad des Tumors, die Hämangiose und die Lymphangiose schienen keine Wirkung auf das Auftreten von Rezidiven zu haben. In der multivariaten Analyse stellten sich die Peritonealkarzinose und die Hämangiose als unabhängige Faktoren für das rezidivfreie Überleben dar.

Eine höhere Tendenz zur Metastasenentwicklung zeigten die Patientinnen mit Lymphknotenbefall, einem Aszites oder einer Peritonealkarzinose. Von den oben aufgezählten Faktoren führten in der Kaplan-Maier Analyse alle, einschließlich des fortgeschrittenen FIGO-Stadiums, des schlechten Tumordifferenzierungsgrad und des postoperativen Tumorrestes, zu einer signifikant kürzeren Überlebenszeit der Patientinnen. Allerdings zeigten sich nur der Tumorgrad, der postoperative Tumorrest und die Peritonealkarzinose als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben.

Die Ergebnisse der Bedeutung der klassischen prognostischen Faktoren der vorliegenden Arbeit ähneln zum Teil den in der Literatur beschriebenen. Dennoch unterscheiden sich die Meinungen der verschiedenen Autoren bezüglich einzelner Faktoren. Die Ergebnisse der Studie von Clark et al. [104] zeigen ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko bei höherem Lebensalter, fortgeschrittenem FIGO-Stadium, niedrigem Differenzierungsgrad, der Histologie (gemischter mesodermaler und endometroider Tumortyp und Klarzellkarzinom, verglichen mit serösem) der Anwesenheit von Aszites, schlechterem Allgemeinstatus, größerem Tumorrest und niedrigem Albuminspiegel.

Marx et al. [101] und Hornung et al. [99] fanden, dass das FIGO-Stadium, der histologische Tumorsubtyp, das Patientinnenalter, der Differenzierungsgrad und der Tumorrest eine signifikante prognostische Bedeutung für das Ovarialkarzinom haben. Manche Faktoren haben eine größere Aussagekraft über die Prognose, wenn sie in Interaktion mit anderen Faktoren beobachtet werden, z.B. FIGO-Stadium und CA 125 [106], FIGO-Stadium und Tumorgrad [107], FIGO-Stadium und Histologie (insbesondere muzinös) [107], Tumorgrad und Histologie [108].

Eine 2007 publizierte Studie von Tuefferd et al. [237] zeigte in der univariaten Analyse, dass fortgeschrittenes Ovarialkarzinom-Stadium, Aszites und grösserer Tumorrest nach der Primäroperation mit einer kürzeren Überlebenszeit und früherem Auftreten von Rezidiven verbunden waren. In der multivariaten Analyse verhielt sich nur der Aszites als unabhängiger Faktor für eine schlechtere Prognose.

Die Ähnlichkeit der Ergebnisse dieser Arbeit zu den Ergebnissen der Literatur bezüglich des Einflusses der klassischen prognostischen Faktoren auf die Tumorentwicklung und das Überleben der Ovarialkarzinompatientinnen zeigt die Validität der Ergebnisse dieser Arbeit und ermöglicht eine aussagekräftige Analyse von HER-2/neu- und Knochenmarkstatus.

In dieser Arbeit zeigten sich die HER-2/neu IHC 2+/3+ Proteinexpression und Genamplifikation als Faktoren für biologisch aggressivere Ovarialtumoren, die zu einer früheren Rezidiv- beziehungsweise Metastasierungsneigung führen und damit mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind. Andererseits hilft die Bestimmung dieser und anderer Faktoren des Ovarialkarzinoms eine gezielte und individualisierte Therapie zu entwickeln.

## **6. Zusammenfassung**

Die Bestimmung des HER-2/neu Status und der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark haben sich als wichtige prognostische Faktoren für Patientinnen mit primärem Brustkarzinom erwiesen. Für Ovarialkarzinompatientinnen sind die unterschiedlichen Studienergebnisse widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die HER-2/neu Proteinüberexpression, die HER-2/neu Genamplifikation und das Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom in Korrelation zueinander untersucht. Anschließend wurde die prognostische Bedeutung dieser Faktoren evaluiert.

Bei 19 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 89 (21,3 %) wurden zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Im Median wurden 2 Tumorzellen (im Bereich zwischen 1 und 31) pro 2 Mio analysierten Zellen gefunden. Außer mit dem Lymphknotenbefall ( $p = 0,02$ ) fand sich gegenüber den bekannten etablierten Prognoseparametern (Tumorstadium, histopathologisches Grading, postoperativer Tumorrest, Aszites, Peritonealkarzinose, Lymphangiome, Hämangiome) keine signifikante Korrelation. Bei 25 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 89 (28,1%) wurde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ein positiver HER-2/neu Status immunhistochemisch festgestellt. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern (Tumorstadium, Lymphknotenbefall, histopathologisches Grading, postoperativer Tumorrest, Aszites, Peritonealkarzinose, Lymphangiome, Hämangiome). Bei 9 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 89 (10,1 %) wurde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms ein positiver HER-2/neu Status mittels FISH festgestellt. Die Assoziation mit der Ausbreitung von Tumorzellen in die Blutgefäße war hierbei signifikant ( $p = 0,03$ ) während sie mit dem Vorliegen einer Lymphangiome nur grenzwertig signifikant korrelierte ( $p = 0,09$ ). Eine Korrelation zu den anderen untersuchten etablierten Prognoseparametern (Tumorstadium, Lymphknotenbefall, histopathologisches Grading, postoperativer Tumorrest, Aszites, Peritonealkarzinose) wurde nicht festgestellt.

Des Weiteren korrelierte die Anwesenheit disseminierter Tumorzellen im Knochenmark weder mit der HER-2/neu Proteinüberexpression ( $p = 0,20$ ), noch mit der HER-2/neu Genamplifikation ( $p = 0,43$ ). Es zeigte sich jedoch, dass die HER-2/neu Bestimmung mittels IHC und die Bestimmung mittels FISH signifikant ( $p < 0,001$ ) korrelieren. Dies unterstützt die Meinung, dass beide Methoden zum Nachweis von HER-2/neu benutzt werden können. Andererseits lässt dieses Ergebnis auch vermuten, dass die HER-2/neu Genamplifikation Voraussetzung für eine HER-2/neu Proteinüberexpression ist.

Im Bezug auf das rezidivfreie Überleben ergab sich weder zwischen den Patientenkollektiven bei positivem und negativem Knochenmarkstatus (Log Rank  $p = 0,52$ ) noch zwischen den Patientenkollektiven bei der mittels FISH bestimmten positiven und negativen HER-2/neu Ratio (Log Rank  $p = 0,26$ ) eine Signifikanz. Bei den Patientinnen mit einer bei der Primärdiagnose des Ovarialkarzinoms immunhistochemisch nachgewiesenen HER-2/neu Positivität wurde ein signifikant erhöhtes Risiko (Log Rank  $p = 0,02$ ) für die Entwicklung eines Rezidivs festgestellt.

Beim Analysieren des metastasenfreien Überlebens ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem und negativem Knochenmarkstatus (Log Rank  $p = 0,87$ ), beziehungsweise HER-2/neu IHC-Status ( $p=0,66$ ). Allerdings war die HER-2/neu Genamplifikation signifikant mit einem kürzeren metastasenfreien Überleben assoziiert ( $p = 0,02$ ).

Weder zwischen den Patientenkollektiven mit positivem und negativem Knochenmarkstatus (Log Rank  $p = 0,81$ ), noch zwischen den Patientenkollektiven mit positivem und negativem immunhistochemisch nachgewiesenem HER-2/neu Status (Log Rank  $p = 0,32$ ), noch zwischen den Patientenkollektiven mit positivem und negativem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status (Log Rank  $p = 0,38$ ) ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens.

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die HER-2/neu IHC 2+ und 3+ Proteinexpression ( $p = 0,001$ ), die Peritonealkarzinose ( $p = 0,008$ ) und die Hämangiose ( $p = 0,032$ ) als unabhängige Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben stehen. Im Bezug auf das metastasenfreie Überleben fand sich kein

signifikanter Parameter. Eine statistisch signifikante unabhängige prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben hatten die klassischen Prognoseparameter Tumordifferenzierungsgrad ( $p = 0,025$ ), postoperativer Tumorrest ( $p = 0,007$ ) und Peritonealkarzinose ( $p = 0,01$ ).

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit ist, dass die HER-2/neu-Genamplifikation und Proteinexpression bei Ovarialkarzinompatientinnen zur Prognoseabschätzung hinsichtlich einer Fernmetastasierung und des Rezidivrisikos geeignet sein könnten. Eine genaue Beurteilung des HER-2/neu-Status ergibt sich aus der Kombination beider Methoden, IHC und FISH. Die Bestätigung dieser Ergebnisse an einem größeren und standardisierten Kollektiv wäre wünschenswert. Die Untersuchung weiterer tumorbiologischer Faktoren des Ovarialkarzinoms könnte eine individuellere Risikoabschätzung ermöglichen und Basis für zielgerichtete Therapien sein.



## **7. Literaturverzeichnis**

1. Gabriel, B., D.C. Fischer, and D.G. Kieback, Molecular mechanisms in signal transduction: new targets for the therapy of gynecologic malignancies. *Onkologie*, 2002. 25(3): p. 240-7.
2. Leon Speroff, R.H.G., Nathan G. Kase, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 1999. sixth.
3. Hogdall, E.V., et al., Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer*, 2003. 98(1): p. 66-73.
4. Afify, A.M., B.A. Werness, and H.F. Mark, HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 1999. 66(2): p. 163-9.
5. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland*. Saarbrücken. 1999.
6. Schildkraut, J.M. and W.D. Thompson, Familial ovarian cancer: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*, 1988. 128(3): p. 456-66.
7. Whittemore, A.S., Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol*, 1994. 55(3 Pt 2): p. S15-9.
8. Cannistra, S.A., Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, 2004. 351(24): p. 2519-29.
9. King, M.C., J.H. Marks, and J.B. Mandell, Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 2003. 302(5645): p. 643-6.
10. Scully, R., et al., Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science*, 1996. 272(5258): p. 123-6.
11. Meindl, A., Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer*, 2002. 97(4): p. 472-80.
12. Ben David, Y., et al., Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol*, 2002. 20(2): p. 463-6.

13. Moslehi, R., et al., BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(4): p. 1259-72.
14. L. Ries, M.E., C. Kosary, B. Hankey, B. Miller, L. Clegg et al., SEER cancer statistics review, N.c.i. (2003), Editor. 1975\_2002.
15. Metcalfe, K.A., et al., The Risk of Ovarian Cancer After Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Carriers. *Obstet Gynecol Surv*, 2005. 60(4): p. 235-236.
16. Brose, M.S., et al., Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(18): p. 1365-72.
17. Ford, D., et al., Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(3): p. 676-89.
18. Chung, D.C. and A.K. Rustgi, The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*, 2003. 138(7): p. 560-70.
19. Schildkraut, J.M., E. Bastos, and A. Berchuck, Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(13): p. 932-8.
20. Weinberg, R.A., How cancer arises. *Sci Am*, 1996. 275(3): p. 62-70.
21. Berek, J.S., et al., Molecular and biological factors in the pathogenesis of ovarian cancer. *Ann Oncol*, 1993. 4 Suppl 4: p. 3-16.
22. Eccles, D.M., et al., Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 1992. 65(1): p. 40-4.
23. Godwin, A.K., et al., A common region of deletion on chromosome 17q in both sporadic and familial epithelial ovarian tumors distal to BRCA1. *Am J Hum Genet*, 1994. 55(4): p. 666-77.
24. Foulkes, W.D., et al., Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 1993. 54(2): p. 220-5.
25. Feki, A. and I. Irminger-Finger, Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. 52(2): p. 103-16.

26. Riedel, H., J. Schlessinger, and A. Ullrich, A chimeric, ligand-binding v-erbB/EGF receptor retains transforming potential. *Science*, 1987. 236(4798): p. 197-200.
27. Ullrich, A. and J. Schlessinger, Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990. 61(2): p. 203-12.
28. Honegger, A.M., et al., A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(12): p. 4568-71.
29. Hunter, T., Signaling--2000 and beyond. *Cell*, 2000. 100(1): p. 113-27.
30. Tsatsanis, C. and D.A. Spandidos, The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). *Int J Mol Med*, 2000. 5(6): p. 583-90.
31. Berchuck, A. and M. Carney, Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol*, 1997. 54(5): p. 541-4.
32. Reese, D.M. and D.J. Slamon, HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells*, 1997. 15(1): p. 1-8.
33. Bast, R.C., Jr., et al., Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 1993. 71(4 Suppl): p. 1597-601.
34. O'Rourke, D.M., X. Zhang, and M.I. Greene, Principles of receptor-based inhibition of erbB family receptor kinases: prospects for new therapies for human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997. 109(3): p. 209-19.
35. Wosikowski, K., et al., Identification of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 pathway inhibitors by correlation with gene expression patterns. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(20): p. 1505-15.
36. Dougall, W.C., et al., The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene*, 1994. 9(8): p. 2109-23.
37. Lee, K.F., et al., Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*, 1995. 378(6555): p. 394-8.
38. Gassmann, M., et al., Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*, 1995. 378(6555): p. 390-4.
39. Threadgill, D.W., et al., Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 1995. 269(5221): p. 230-4.

40. Katso, R.M., et al., Molecular approaches to diagnosis and management of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 1997. 16(1-2): p. 81-107.
41. Scoccia, B., et al., Expression of the ErbB family of receptors in ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig*, 1998. 5(3): p. 161-5.
42. Shih, C., et al., Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 1981. 290(5803): p. 261-4.
43. Khalifa, M.A., et al., Immunohistochemical assessment of proliferation markers and altered gene expression in archival specimens of ovarian epithelial tumors. *Cancer Detect Prev*, 1997. 21(6): p. 532-9.
44. Coussens, L., et al., Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 1985. 230(4730): p. 1132-9.
45. Slamon, D.J., et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989. 244(4905): p. 707-12.
46. Schechter, A.L., et al., The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 1984. 312(5994): p. 513-6.
47. Marchionni, M.A., et al., Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature*, 1993. 362(6418): p. 312-8.
48. Davis, J.G., et al., Isolation and characterization of a neu protein-specific activating factor from human ATL-2 cell conditioned medium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 179(3): p. 1536-42.
49. Dobashi, K., et al., Characterization of a neu/c-erbB-2 protein-specific activating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(19): p. 8582-6.
50. Corfas, G., D.L. Falls, and G.D. Fischbach, ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, also induces tyrosine phosphorylation of a 185-kDa muscle transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(4): p. 1624-8.
51. Lupu, R., et al., Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(6): p. 2287-91.
52. Xia, W., et al., Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene*, 2004. 23(3): p. 646-53.

53. Mudge, A.W., Neural development: new ligands for Neu? *Curr Biol*, 1993. 3(6): p. 361-4.
54. Falls, D.L., et al., ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell*, 1993. 72(5): p. 801-15.
55. Kao, M.C., et al., The N-terminal 178-amino-acid domain only of the SV40 large T antigen acts as a transforming suppressor of the HER-2/neu oncogene. *Oncogene*, 1998. 16(4): p. 547-54.
56. Campiglio, M., et al., Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *J Cell Biochem*, 1999. 73(4): p. 522-32.
57. Goldman, R., et al., Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry*, 1990. 29(50): p. 11024-8.
58. Kokai, Y., et al., Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell*, 1989. 58(2): p. 287-92.
59. Wada, T., X.L. Qian, and M.I. Greene, Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell*, 1990. 61(7): p. 1339-47.
60. Qian, X., et al., Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: a mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(4): p. 1500-4.
61. Qian, X., et al., Domain-specific interactions between the p185(neu) and epidermal growth factor receptor kinases determine differential signaling outcomes. *J Biol Chem*, 1999. 274(2): p. 574-83.
62. Skirnisdottir, I., B. Sorbe, and T. Seidal, The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 2001. 11(2): p. 119-29.
63. Harlozinska, A., et al., Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 oncoproteins in tissue and tumor effusion cells of histopathologically different ovarian neoplasms. *Tumour Biol*, 1998. 19(5): p. 364-73.
64. Bast, R.C., Jr., et al., Coexpression of the HER-2 gene product, p185HER-2, and epidermal growth factor receptor, p170EGF-R, on epithelial ovarian cancers and normal tissues. *Hybridoma*, 1998. 17(4): p. 313-21.

65. Chang, L. and M. Karin, Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001. 410(6824): p. 37-40.
66. Carraway, K.L., 3rd, et al., Heregulin stimulates mitogenesis and phosphatidylinositol 3-kinase in mouse fibroblasts transfected with erbB2/neu and erbB3. *J Biol Chem*, 1995. 270(13): p. 7111-6.
67. Ignatoski, K.M., et al., ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer*, 2000. 82(3): p. 666-74.
68. De Potter, C.R., et al., The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells. *Int J Cancer*, 1989. 44(6): p. 969-74.
69. Vernimmen, D., et al., Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers. *Br J Cancer*, 2003. 89(5): p. 899-906.
70. Huang, T.J., et al., Dual fluorescence in situ hybridization in detection of HER-2 oncogene amplification in primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004. 3(1): p. 62-8.
71. Slamon, D.J., et al., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001. 344(11): p. 783-92.
72. Potti, A., et al., Immunohistochemical identification of HER-2/neu overexpression and CD117 (c-kit) expression in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 2002. 43(12): p. 2427-30.
73. Santin, A.D., et al., Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(5): p. 1271-9.
74. Koka, V., et al., Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res*, 2002. 22(3): p. 1593-7.
75. Hollywood, D.P. and H.C. Hurst, A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *Embo J*, 1993. 12(6): p. 2369-75.
76. Grooteclaes, M., et al., A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1999. 59(11): p. 2527-31.

77. Pasleau, F., M. Grootenlaes, and R. Gol-Winkler, Expression of the c-erbB2 gene in the BT474 human mammary tumor cell line: measurement of c-erbB2 mRNA half-life. *Oncogene*, 1993. 8(4): p. 849-54.
78. Boshier, J.M., et al., A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene*, 1996. 13(8): p. 1701-7.
79. Vernimmen, D., et al., Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem J*, 2003. 370(Pt 1): p. 323-9.
80. Scott, G.K., et al., Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene*, 2000. 19(55): p. 6490-502.
81. Lassus, H., et al., ERBB2 amplification is superior to protein expression status in predicting patient outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2004. 92(1): p. 31-9.
82. Grootenlaes, M., et al., The 6-kilobase c-erbB2 promoter contains positive and negative regulatory elements functional in human mammary cell lines. *Cancer Res*, 1994. 54(15): p. 4193-9.
83. Newman, S.P., et al., Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene*, 2000. 19(4): p. 490-7.
84. Nezu, M., et al., Identification of a novel promoter and exons of the c-ERBB-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 258(3): p. 499-505.
85. Scott, G.K., et al., A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(4): p. 2247-57.
86. Doherty, J.K., et al., An alternative HER-2/neu transcript of 8 kb has an extended 3'UTR and displays increased stability in SKOV-3 ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 1999. 74(3): p. 408-15.
87. Doherty, J.K., et al., The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(19): p. 10869-74.
88. Siegel, P.M., et al., Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *Embo J*, 1999. 18(8): p. 2149-64.

89. Zabrecky, J.R., et al., The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem*, 1991. 266(3): p. 1716-20.
90. Pupa, S.M., et al., The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene*, 1993. 8(11): p. 2917-23.
91. Esparis-Ogando, A., E. Diaz-Rodriguez, and A. Pandiella, Signalling-competent truncated forms of ErbB2 in breast cancer cells: differential regulation by protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*, 1999. 344 Pt 2: p. 339-48.
92. Link, C.J., Jr., et al., Borderline ovarian tumors. *Am J Med*, 1996. 101(2): p. 217-25.
93. Barakat, R.R., Borderline tumors of the ovary. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1994. 21(1): p. 93-105.
94. Trope, C. and J. Kaern, Management of borderline tumors of the ovary: state of the art. *Semin Oncol*, 1998. 25(3): p. 372-80.
95. Hogberg, T., J. Carstensen, and E. Simonsen, Treatment results and prognostic factors in a population-based study of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1993. 48(1): p. 38-49.
96. Kehoe, S., et al., The influence of the operating surgeon's specialisation on patient survival in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 1994. 70(5): p. 1014-7.
97. Kosary, C.L., FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Semin Surg Oncol*, 1994. 10(1): p. 31-46.
98. Brun, J.L., et al., Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2000. 78(1): p. 21-7.
99. Hornung, R., et al., Analysis of potential prognostic factors in 111 patients with ovarian cancer. *Cancer Lett*, 2004. 206(1): p. 97-106.
100. Makar, A.P., et al., The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1995. 56(2): p. 175-80.



101. Marx, D., et al., Mib-1 evaluated proliferative activity in ovarian cancer with respect to prognostic significance. *Anticancer Res*, 1997. 17(1B): p. 775-80.
102. Gershenson, D.M., et al., Age contrasts in patients with advanced epithelial ovarian cancer. The M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*, 1993. 71(2 Suppl): p. 638-43.
103. Ries, L.A., Ovarian cancer. Survival and treatment differences by age. *Cancer*, 1993. 71(2 Suppl): p. 524-9.
104. Clark, T.G., et al., A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2001. 85(7): p. 944-52.
105. Baak, J.P., et al., Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. *Pathol Res Pract*, 1987. 182(6): p. 755-74.
106. Peters-Engl, C., et al., CA 125 regression after two completed cycles of chemotherapy: lack of prediction for long-term survival in patients with advanced ovarian cancer. *Br J Cancer*, 1999. 81(4): p. 662-6.
107. Lund, B., et al., Comparison of the predictive power of different prognostic indices for overall survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 1990. 50(15): p. 4626-9.
108. Carey, M.S., et al., Testing the validity of a prognostic classification in patients with surgically optimal ovarian carcinoma: a 15-year review. *Int J Gynecol Cancer*, 1993. 3(1): p. 24-35.
109. Redman, J.R., et al., Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*, 1986. 4(4): p. 515-23.
110. Trope, C., Prognostic factors in ovarian cancer. *Cancer Treat Res*, 1998. 95: p. 287-352.
111. Sugiyama, T., et al., Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer*, 2000. 88(11): p. 2584-9.
112. Sorbe, B., B. Frankendal, and B. Veress, Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol*, 1982. 59(5): p. 576-82.
113. Young, R.C., et al., Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med*, 1990. 322(15): p. 1021-7.

114. McGuire, W.P., et al., Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*, 1996. 334(1): p. 1-6.
115. Ferrandina, G., et al., NM23 in Ovarian Cancer. Correlation with clinicopathological and biochemical parameters. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. 784: p. 509-12.
116. Kapitanovic, S., et al., nm23-H1 gene expression in ovarian tumors--a potential tumor marker. *Anticancer Res*, 1995. 15(2): p. 587-90.
117. Niwa, K., et al., Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer*, 1994. 70(6): p. 1191-7.
118. Smith-Sorensen, B., et al., Therapy effect of either paclitaxel or cyclophosphamide combination treatment in patients with epithelial ovarian cancer and relation to TP53 gene status. *Br J Cancer*, 1998. 78(3): p. 375-81.
119. Shahin, M.S., et al., The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. *Cancer*, 2000. 89(9): p. 2006-17.
120. Reles, A., et al., Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(10): p. 2984-97.
121. Fallows, S., et al., P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J Pathol*, 2001. 194(1): p. 68-75.
122. Schuyer, M., et al., Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. *Br J Cancer*, 2001. 85(9): p. 1359-67.
123. Nagele, E., et al., -CA-125 antigen as a prognostic factor for survival in patients with epithelial ovarian carcinoma of FIGO stage I--preliminary results. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 1996. 56(2): p. 79-82.
124. Onetto, M., et al., Evaluation of the ovarian cancer antigen, Ca-125, as a tumor marker. *Oncology*, 1989. 46(2): p. 117-22.
125. Sevelde, P., M. Schemper, and J. Spona, CA 125 as an independent prognostic factor for survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 161(5): p. 1213-6.

126. Rustin, G.J., et al., Use of CA-125 to predict survival of patients with ovarian carcinoma. North Thames Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 1989. 7(11): p. 1667-71.
127. Mogensen, O., Prognostic value of CA 125 in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1992. 44(3): p. 207-12.
128. Cruickshank, D.J., W.T. Fullerton, and A. Klopfer, The clinical significance of pre-operative serum CA 125 in ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*, 1987. 94(7): p. 692-5.
129. Munstedt, K., et al., Steroid hormone receptors and long term survival in invasive ovarian cancer. *Cancer*, 2000. 89(8): p. 1783-91.
130. Langdon, S.P., et al., Functionality of the progesterone receptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(9): p. 2245-51.
131. Slotman, B.J., J.J. Nauta, and B.R. Rao, Survival of patients with ovarian cancer. Apart from stage and grade, tumor progesterone receptor content is a prognostic indicator. *Cancer*, 1990. 66(4): p. 740-4.
132. Geisler, J.P. and H.E. Geisler, Tumor markers and molecular biological markers in gynecologic malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2001. 13(1): p. 31-9.
133. Abdul-Karim, F.W., et al., Bone metastasis from gynecologic carcinomas: a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol*, 1990. 39(2): p. 108-14.
134. Dauplat, J., et al., Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*, 1987. 60(7): p. 1561-6.
135. Braun, S., et al., A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, 2005. 353(8): p. 793-802.
136. Braun, S., et al., Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol*, 2001. 19(2): p. 368-75.
137. Braun, S., et al., Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*, 2000. 342(8): p. 525-33.
138. Pantel, K., R.J. Cote, and O. Fodstad, Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(13): p. 1113-24.

- 
139. Skirnisdottir, I., B. Sorbe, and T. Seidal, P53, bcl-2, and bax: their relationship and effect on prognosis in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 2001. 11(2): p. 147-58.
  140. Seki, A., et al., Detection of c-erbB-2 and FGF-3 (INT-2) gene amplification in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol*, 2000. 17(1): p. 103-6.
  141. Yang, H., G. Zhang, and K. Xu, [c-erbB2 gene amplification in human primary epithelial ovarian cancer and its clinical significance]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 1998. 20(5): p. 367-70.
  142. Leng, J., et al., Overexpression of p53, EGFR, c-erbB2 and c-erbB3 in endometrioid carcinoma of the ovary. *Chin Med Sci J*, 1997. 12(2): p. 67-70.
  143. Felip, E., et al., Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer*, 1995. 75(8): p. 2147-52.
  144. Berchuck, A., et al., Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 1990. 50(13): p. 4087-91.
  145. Meden, H. and W. Kuhn, Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997. 71(2): p. 173-9.
  146. Fajac, A., et al., c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int J Cancer*, 1995. 64(2): p. 146-51.
  147. Tanabe, H., et al., Overexpression of HER-2/neu is not a risk factor in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 2004. 94(3): p. 735-9.
  148. Arts, H.J., et al., Options for modulation of drug resistance in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2000. 10(S1): p. 47-52.
  149. Schneider, J., et al., Correlation of MDR1 expression and oncogenic activation in human epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 1997. 17(3C): p. 2147-51.
  150. Tsunematsu, R., et al., Hypercalcemia due to parathyroid hormone-related protein produced by primary ovarian clear cell adenocarcinoma: case report. *Gynecol Oncol*, 2000. 76(2): p. 218-22.

151. Furneaux, H.M., et al., Selective expression of Purkinje-cell antigens in tumor tissue from patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *N Engl J Med*, 1990. 322(26): p. 1844-51.
152. Holguin, T., R.S. Padilla, and F. Ampuero, Ovarian adenocarcinoma presenting with the sign of Leser-Trelat. *Gynecol Oncol*, 1986. 25(1): p. 128-32.
153. Evans, T.R., J.L. Mansi, and D.H. Bevan, Trousseau's syndrome in association with ovarian carcinoma. *Cancer*, 1996. 77(12): p. 2544-9.
154. Raffel, G.D., et al., Diagnostic dilemmas in oncology: case 2. Dermatomyositis and ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 2001. 19(23): p. 4341-3.
155. Medsger, T.A., J.A. Dixon, and V.F. Garwood, Palmar fasciitis and polyarthritis associated with ovarian carcinoma. *Ann Intern Med*, 1982. 96(4): p. 424-31.
156. van Nagell, J.R., Jr. and F.R. Ueland, Ultrasound evaluation of pelvic masses: predictors of malignancy for the general gynecologist. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1999. 11(1): p. 45-9.
157. Granberg, S., M. Wikland, and I. Jansson, Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: criteria to be used for ultrasound evaluation. *Gynecol Oncol*, 1989. 35(2): p. 139-44.
158. Eltabbakh, G.H., et al., Serum CA-125 measurements > 65 U/mL. Clinical value. *J Reprod Med*, 1997. 42(10): p. 617-24.
159. Meyer, T. and G.J. Rustin, Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2000. 82(9): p. 1535-8.
160. Bristow, R.E., et al., Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 2002. 20(5): p. 1248-59.
161. Schumer, S.T. and S.A. Cannistra, Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol*, 2003. 21(6): p. 1180-9.
162. Petru, E., et al., Nongenital cancers metastatic to the ovary. *Gynecol Oncol*, 1992. 44(1): p. 83-6.
163. Young, R.H., C.B. Gilks, and R.E. Scully, Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei. A clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix. *Am J Surg Pathol*, 1991. 15(5): p. 415-29.

164. Young, R.C., et al., Staging laparotomy in early ovarian cancer. *Jama*, 1983. 250(22): p. 3072-6.
165. Maggioni, A., et al., Randomised study of systematic lymphadenectomy in patients with epithelial ovarian cancer macroscopically confined to the pelvis. *Br J Cancer*, 2006. 95(6): p. 699-704.
166. Angioli, R., et al., Update on lymphadenectomy in early and advanced ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2008. 20(1): p. 34-9.
167. Brun, J.L., et al., External validation of a laparoscopic-based score to evaluate resectability of advanced ovarian cancers: clues for a simplified score. *Gynecol Oncol*, 2008. 110(3): p. 354-9.
168. van der Burg, M.E., et al., The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med*, 1995. 332(10): p. 629-34.
169. Fader, A.N. and P.G. Rose, Role of surgery in ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*, 2007. 25(20): p. 2873-83.
170. Riener, E.K., et al., The prognostic and predictive value of immunohistochemically detected HER-2/neu overexpression in 361 patients with ovarian cancer: a multicenter study. *Gynecol Oncol*, 2004. 95(1): p. 89-94.
171. Harries, M. and M. Gore, Part I: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol*, 2002. 3(9): p. 529-36.
172. Young, R.C., Early-stage ovarian cancer: to treat or not to treat. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(2): p. 94-5.
173. Young, R.C., et al., Adjuvant treatment for early ovarian cancer: a randomized phase III trial of intraperitoneal 32P or intravenous cyclophosphamide and cisplatin--a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*, 2003. 21(23): p. 4350-5.
174. Markman, M., Informing patients with cancer of "new findings" that may influence their willingness to participate in research studies. *Cancer*, 2003. 98(5): p. 885-7.
175. Vasey, P.A., et al., SCOTROC 2A: carboplatin followed by docetaxel or docetaxel-gemcitabine as first-line chemotherapy for ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2006. 94(1): p. 62-8.

176. Piccart, M.J., et al., Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(9): p. 699-708.
177. Ozols, R.F., et al., Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 2003. 21(17): p. 3194-200.
178. du Bois, A., et al., A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(17): p. 1320-9.
179. Zhou, R., et al., Effects of prolonged tamoxifen treatment on receptor expression and apoptosis of ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(3): p. 678-83.
180. Zapletalova, K., et al., [Immunotherapy--perspectives in therapy of ovarian carcinomas]. *Ceska Gynekol*, 2004. 69(5): p. 372-5.
181. Disis, M.L., et al., Flt3 ligand as a vaccine adjuvant in association with HER-2/neu peptide-based vaccines in patients with HER-2/neu-overexpressing cancers. *Blood*, 2002. 99(8): p. 2845-50.
182. Baxevanis, C.N., et al., HER-2/neu-derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic CD3(+)CD56(+) (natural killer T) lymphocytes. *Int J Cancer*, 2002. 98(6): p. 864-72.
183. Fendly, B.M., et al., Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res*, 1990. 50(5): p. 1550-8.
184. Lewis, G.D., et al., Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. 37(4): p. 255-63.
185. Carter, P., et al., Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(10): p. 4285-9.
186. Clynes, R.A., et al., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 2000. 6(4): p. 443-6.
187. Yakes, F.M., et al., Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*, 2002. 62(14): p. 4132-41.

188. Cuello, M., et al., Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*, 2001. 61(12): p. 4892-900.
189. Agus, D.B., et al., Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2002. 2(2): p. 127-37.
190. Le, X.F., et al., The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem*, 2003. 278(26): p. 23441-50.
191. Bei, R., et al., Immune responses to all ErbB family receptors detectable in serum of cancer patients. *Oncogene*, 1999. 18(6): p. 1267-75.
192. Disis, M.L., et al., Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res*, 1994. 54(1): p. 16-20.
193. Disis, M.L., et al., High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 1997. 15(11): p. 3363-7.
194. Montgomery, R.B., et al., Endogenous anti-HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res*, 2005. 65(2): p. 650-6.
195. Willems, A., et al., Antibody therapy for breast cancer. *Anticancer Res*, 2005. 25(3A): p. 1483-9.
196. Bookman, M.A., et al., Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol*, 2003. 21(2): p. 283-90.
197. Baselga, J., et al., Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, 1999. 26(4 Suppl 12): p. 78-83.
198. Noonberg, S.B. and C.C. Benz, Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 2000. 59(4): p. 753-67.
199. Ciardiello, F., et al., Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(5): p. 1459-65.



200. Ciardiello, F., et al., Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(5): p. 2053-63.
201. Zhang, L., et al., Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene*, 1998. 16(22): p. 2855-63.
202. Garcia, R., et al., Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 2001. 20(20): p. 2499-513.
203. Karni, R., R. Jove, and A. Levitzki, Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene*, 1999. 18(33): p. 4654-62.
204. Ueno, N.T., et al., E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(1): p. 250-9.
205. Hortobagyi, G.N., et al., Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J Clin Oncol*, 2001. 19(14): p. 3422-33.
206. Pantel, K., E. Felber, and G. Schlimok, Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother*, 1994. 3(4): p. 315-22.
207. Pantel, K., et al., Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother*, 1994. 3(3): p. 165-73.
208. Pantel, K. and G. Riethmuller, Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996. 213 (Pt 3): p. 1-18.
209. Altmann U, K.F., Tafazzoli AG, Haeberlin V, Dudeck J., GTDS -a tool for tumor registries to support shared patient care. *Proc.AMIA.Annu.Fall.Symp.*, 1996. 512(16).
210. Kaplan EL, M.P., Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc*, 1958(53): p. 457-81.
211. DR, C., Regression models and life tables. *J. R. Stat. Soc. B.*, 1972(34): p. 187-220.

212. Stewart, S.L., et al., Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium. *J Cell Physiol*, 2004. 198(1): p. 119-24.
213. Hellman, S., Stopping metastases at their source. *N Engl J Med*, 1997. 337(14): p. 996-7.
214. Stigbrand, T., et al., Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol*, 1998. 19(2): p. 132-52.
215. Borgen E, N.B., Nesland JM, et al, Standardisation of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood: I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*, 1999. 1: p. 377-388.
216. Ross, A.A., et al., Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant*, 1995. 15(6): p. 929-33.
217. Cain, J.M., et al., Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunocytochemical assessment. *Gynecol Oncol*, 1990. 38(3): p. 442-5.
218. Fehm, T., et al., Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol*, 2006. 103(3): p. 942-7.
219. Schindlbeck, C., et al., Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. 17(5): p. 1047-55.
220. Haag, H., Müller, Gynäkologie und Urologie. 2 ed. 2005/06, Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
221. Wolff, A.C., et al., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 2007. 131(1): p. 18.
222. Slamon, D.J., et al., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987. 235(4785): p. 177-82.
223. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1999. 112(1 Suppl 1): p. S53-67.

224. Wright, C., et al., Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*, 1989. 49(8): p. 2087-90.
225. Lovekin, C., et al., c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 1991. 63(3): p. 439-43.
226. Winstanley, J., et al., The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1991. 63(3): p. 447-50.
227. McCann, A.H., et al., Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, 1991. 51(12): p. 3296-303.
228. Peethambaram, P.P., et al., Her-2/neu expression in ovarian cancer: pre- and postexposure to platinum chemotherapy. *Gynecol Oncol*, 2003. 89(1): p. 99-104.
229. Rubin, S.C., et al., Prevalence and significance of HER-2/neu expression in early epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 1994. 73(5): p. 1456-9.
230. Rubin, S.C., et al., Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. 168(1 Pt 1): p. 162-9.
231. Hellstrom, I., et al., Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 2001. 61(6): p. 2420-3.
232. McKenzie, S.J., et al., Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer. *Cancer*, 1993. 71(12): p. 3942-6.
233. Berchuck, A., Biomarkers in the ovary. *J Cell Biochem Suppl*, 1995. 23: p. 223-6.
234. Cirisano, F.D. and B.Y. Karlan, The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers. *J Soc Gynecol Investig*, 1996. 3(3): p. 99-105.
235. Camilleri-Broet, S., et al., HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol*, 2004. 15(1): p. 104-12.
236. Vermeij, J., et al., Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 3.
237. Tuefferd, M., et al., HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS ONE*, 2007. 2(11): p. e1138.

238. Steffensen, K.D., et al., The prognostic importance of cyclooxygenase 2 and HER2 expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. 17(4): p. 798-807.
239. Corbett, I.P., et al., NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*, 1990. 161(1): p. 15-25.
240. Kallioniemi, O.P., et al., Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*, 1991. 49(5): p. 650-5.
241. Singleton, T.P., et al., Detection of c-erbB-2 activation in paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry. *Hum Pathol*, 1992. 23(10): p. 1141-50.
242. Cobleigh, M.A., et al., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, 1999. 17(9): p. 2639-48.
243. Leeson, S.C., et al., c-erbB-2 oncogene expression in Stage I epithelial ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*, 1995. 102(1): p. 65-7.
244. Tomic, S., et al., c-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Croat Med J*, 2003. 44(4): p. 429-34.
245. Eltabbakh, G.H., et al., Epidemiologic differences between women with borderline ovarian tumors and women with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1999. 74(1): p. 103-7.
246. Heinrich, J.K., et al., HER-2 and cancer antigen 125 evaluation in ovarian borderline tumors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. 14(6): p. 1078-85.
247. Kupryjanczyk J, M.R., Plisiecka-Halasa J, Bar J, Kraszewska E, Ziolkowska I, Timorek A, Stelmachow J, Emerich J, Jedryka M, Pluzanska A, Rzepka-Gorska I, Urbanski K, Zielinski J, Markowska J., TP53 status determines clinical significance of ERBB2 expression in ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2004. 91(11): p. 1916 - 1923.
248. Wu, Y., et al., Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms. *Gynecol Oncol*, 2004. 95(3): p. 570-5.

249. Iwamoto, H., et al., HER-2/neu expression in ovarian clear cell carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 2003. 13(1): p. 28-31.
250. Ferrandina, G., et al., Cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermal growth factor receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2002. 85(2): p. 305-10.
251. Seidman, J.D., R.J. Kurman, and B.M. Ronnett, Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol*, 2003. 27(7): p. 985-93.
252. Wang, D.P., et al., Immunohistochemical localization of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor in normal surface epithelium, surface inclusion cysts, and common epithelial tumours of the ovary. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1992. 421(5): p. 393-400.
253. Gao, D., et al., Significance of HER-2/neu expression in ovarian epithelial tumours. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2002. 31(3): p. 268-70.
254. Kacinski, B.M., et al., NEU protein overexpression in benign, borderline, and malignant ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol*, 1992. 44(3): p. 245-53.
255. van der Zee, A.G., et al., Value of P-glycoprotein, glutathione S-transferase pi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas. *J Clin Oncol*, 1995. 13(1): p. 70-8.
256. Scambia, G., et al., Expression of HER-2/neu oncoprotein, DNA-ploidy and S-phase fraction in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 1993. 3(5): p. 271-278.
257. Ross, J.S., et al., HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol*, 1999. 111(3): p. 311-6.
258. Medl, M., et al., DNA amplification of HER-2/neu and INT-2 oncogenes in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1995. 59(3): p. 321-6.
259. Singleton, T.P., et al., Activation of c-erbB-2 and prognosis in ovarian carcinoma. Comparison with histologic type, grade, and stage. *Cancer*, 1994. 73(5): p. 1460-6.
260. Mano, M.S., et al., Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2004. 92(3): p. 887-95.

261. Frutuoso, C., et al., [Prognosis value of p53, C-erbB-2 and Ki67 proteins in ovarian carcinoma]. *Acta Med Port*, 2001. 14(3): p. 277-83.
262. Young, S.R., et al., ERBB2 and chromosome 17 centromere studies of ovarian cancer by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. 16(2): p. 130-7.
263. Ferrandina, G., et al., Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinico-pathological, surgical and apoptosis-related parameters. *Br J Cancer*, 2005. 92(2): p. 271-7.
264. Haldane, J.S., et al., c-erbB-2 oncogene expression in ovarian cancer. *J Pathol*, 1990. 162(3): p. 231-7.
265. Tanner, B., et al., Prognostic significance of c-erbB-2 mRNA in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1996. 62(2): p. 268-77.
266. Nielsen, J.S., et al., Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. 14(6): p. 1086-96.
267. Altman, D.G., Systematic reviews of evaluations of prognostic variables. *Bmj*, 2001. 323(7306): p. 224-8.
268. Simon, R. and D.G. Altman, Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. *Br J Cancer*, 1994. 69(6): p. 979-85.
269. Fukushi, Y., et al., Detection of numerical aberration in chromosome 17 and c-erbB2 gene amplification in epithelial ovarian cancer using recently established dual color FISH. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2001. 22(1): p. 23-5.
270. Zhang, X., et al., Amplification and rearrangement of c-erb B proto-oncogenes in cancer of human female genital tract. *Oncogene*, 1989. 4(8): p. 985-9.
271. Kury, F.D., et al., Determination of HER-2/neu amplification and expression in tumor tissue and cultured cells using a simple, phenol free method for nucleic acid isolation. *Oncogene*, 1990. 5(9): p. 1403-8.
272. Zheng, J.P., et al., Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res*, 1991. 51(15): p. 4045-51.
273. Press, M.F., et al., Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a

- molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*, 2002. 20(14): p. 3095-105.
274. Gjerdrum, L.M., et al., Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn*, 2004. 6(1): p. 42-51.
275. Lebeau, A., et al., Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol*, 2001. 19(2): p. 354-63.
276. Kallioniemi, O.P., et al., ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(12): p. 5321-5.
277. Szollosi, J., et al., ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res*, 1995. 55(22): p. 5400-7.
278. Farabegoli, F., et al., c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int J Cancer*, 1999. 84(3): p. 273-7.
279. Pauletti, G., et al., Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 1996. 13(1): p. 63-72.
280. Jacobs, T.W., et al., Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999. 17(7): p. 1974-82.
281. Press, M.F., et al., HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 1997. 15(8): p. 2894-904.
282. Persons, D.L., et al., HER-2 fluorescence in situ hybridization: results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 2006. 130(3): p. 325-31.
283. Dal Lago, L., et al., Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(10): p. 2572-9.
284. Tanner, M., et al., Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*, 2000. 157(5): p. 1467-72.

285. Tubbs, R.R., et al., Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol*, 2001. 19(10): p. 2714-21.
286. Ames, B.N. and L.S. Gold, Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science*, 1990. 249(4972): p. 970-1.
287. Pauletti, G., et al., Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2000. 18(21): p. 3651-64.
288. Barrett, C., et al., Amplification of the HER2 gene in breast cancers testing 2+ weak positive by HercepTest immunohistochemistry: false-positive or false-negative immunohistochemistry? *J Clin Pathol*, 2007. 60(6): p. 690-3.
289. Morali, F., et al., Overexpression of p185 is not related to erbB2 amplification in ovarian cancer. *Ann Oncol*, 1993. 4(9): p. 775-9.
290. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 2000. 80(12): p. 1943-9.



## **8. Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1</b> : Feinaufbau des Ovars.....	9
<b>Abbildung 2.</b> Schematische Darstellung des HER-2/neu Signaltransduktionswegs.	17
<b>Abbildung 3.</b> Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Proteinüberexpression 3+.....	71
<b>Abbildung 4.</b> Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Proteinexpression 1+.....	71
<b>Abbildung 5.</b> Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Gen Amplifikationsrate > 2.....	73
<b>Abbildung 6.</b> Ovarialkarzinomzellen mit HER-2/neu Gen Amplifikationsrate von 2..	73
<b>Abbildung 7.</b> Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	76
<b>Abbildung 8.</b> Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis.....	78
<b>Abbildung 9.</b> Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis.....	79
<b>Abbildung 10.</b> Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus.....	82
<b>Abbildung 11.</b> Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von Aszites bei Primärdiagnose.....	83
<b>Abbildung 12.</b> Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	85
<b>Abbildung 13.</b> Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis.....	86
<b>Abbildung 14.</b> Kaplan-Meier Kurve für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis.....	88
<b>Abbildung 15.</b> Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der Tumorgröße.....	90
<b>Abbildung 16.</b> Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfreie Überleben in Abhängigkeit vom Nachweis eines postoperativen Tumorrests.....	91
<b>Abbildung 17.</b> Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	93
<b>Abbildung 18.</b> Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC HER-2/neu Nachweis.....	94
<b>Abbildung 19.</b> Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FISH HER-2/neu Nachweis.....	95

<b>Abbildung 20</b> Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium.....	97
<b>Abbildung 21.</b> Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der Anwesenheit einer Peritonealkarzinose.....	98

## **9. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.</b> Histologischer Differenzierungsgrad (Grading).....	21
<b>Tabelle 2.</b> Nodalstatus.....	21
<b>Tabelle 3.</b> TNM Klassifikation und FIGO-Stadien .....	22
<b>Tabelle 4.</b> Fernmetastasen.....	23
<b>Tabelle 5.</b> Residualtumor- Klassifikation.....	23
<b>Tabelle 6.</b> Tabelle zur Notierung der Signalausählung.....	50
<b>Tabelle 7.</b> Auswertung der Expressionsrate von HER-2/neu Onkoprotein nach immunhistochemischer Membranfärbung.....	59
<b>Tabelle 8.</b> Patientinnencharakteristika und histologische Tumorparameter in Korrelation zu der Anwesenheit von CK positiven Zellen in Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose.....	68
<b>Tabelle 9.</b> Patientinnencharakteristika und histologische Ovarialkarzinomparameter in Korrelation zu der immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Proteinexpression zum Zeitpunkt der Primärdiagnose.....	70
<b>Tabelle 10.</b> Patientinnencharakteristika und histologische Ovarialkarzinomparameter in Korrelation zu der mittels FISH nachgewiesenen HER-2/neu Genamplifikation zum Zeitpunkt der Primärdiagnose.....	72
<b>Tabelle 11.</b> Korrelation zwischen dem immunhistochemisch und dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.....	74
<b>Tabelle 12.</b> Korrelation zwischen dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.....	75
<b>Tabelle 13.</b> Korrelation zwischen dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.....	75
<b>Tabelle 14.</b> Korrelation zwischen Rezidivereignissen und dem Knochenmarkstatus	77
<b>Tabelle 15.</b> Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.....	79
<b>Tabelle 16.</b> Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.....	80
<b>Tabelle 17.</b> Univariate Analyse nach Kaplan - Meier für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von klassischen prognostischen Faktoren.....	81
<b>Tabelle 18.</b> Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen...	84
<b>Tabelle 19.</b> Korrelation vom Metastasenauftreten mit dem Knochenmarkstatus. ....	86

---

<b>Tabelle 20.</b> Korrelation des metastasenfreien Überlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.....	87
<b>Tabelle 21.</b> Korrelation des metastasenfreien Überlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.....	89
<b>Tabelle 22.</b> Univariate Analyse nach Kaplan - Meier für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von einigen klassischen prognostischen Faktoren.....	89
<b>Tabelle 23.</b> Multivariate Analyse für das metastasenfreie Überleben der Patientinnen.....	90
<b>Tabelle 24.</b> Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem Knochenmarkstatus.....	93
<b>Tabelle 25.</b> Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Status.....	95
<b>Tabelle 26.</b> Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem mittels FISH bestimmten HER-2/neu Status.....	96
<b>Tabelle 27.</b> Univariate Analyse nach Kaplan - Meier für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit von einigen klassischen prognostischen Faktoren.....	97
<b>Tabelle 28.</b> Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen.....	99

## **10. Danksagung**

An erster Stelle sei Herrn Professor Dr. med. Harald Sommer herzlich gedankt für die Betreuung und die Überlassung meiner thematischen Fragestellung.

Danke an Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Janni für die gute Betreuung und für die „rettende Hand“ als ich noch am Anfang meiner Arbeit aus räumlichen Gründen ohne Betreuer blieb.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. med. Dorothea Rjosk bedanken für die intensive Betreuung, grossartige Unterstützung und für die Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Christian Schindlbeck für die Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse.

Grossen Dank an die medizinisch – technischen Assistentinnen des Labors für ihre moralische und fachliche Unterstützung und nicht zuletzt für ihre Geduld, mit der sie mich in die Methoden der Molekularbiologie eingearbeitet haben. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Beate Zill und Frau Sandra Schulze.

Vielen Dank Herrn Dr. rer. nat. Alfred Berkold für die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter und meinem Ehemann danken, die mich in schweren Momenten unterstützt und an mich geglaubt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt zudem allen weiteren Beteiligten, auch wenn sie nicht namentlich genannt sind.

## **11. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name:	Jahns
Vorname:	Boriana
Geborene:	Boradjieva
Geburtsdatum/-ort:	14.05.1978 in Pazardzhik, Bulgarien

### **Schul Ausbildung**

09/1984 – 06/1991	Grundschule „Kliment Ochridski“ in Pazardzhik, Bulgarien
09/1991 – 06/1996	Fremdsprachengymnasium „Bertolt Brecht“ in Pazardzhik, Bulgarien Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulausbildung**

09/1996 – 07/1999	Studium der Humanmedizin an der Trakischen Universität in Stara Zagora, Bulgarien
07/1998	Physikum (in der Trakischen Universität)
10/1999 – 11/2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig – Maximilians – Universität in München
08/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 – 09/2005	Praktisches Jahr
11/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufliche Tätigkeit**

01/2006 – 12/2007	Assistenzärztin an der Universitäts – Frauenklinik der Georg-August-Universität, Göttingen
01/2008 – dato	Assistenzärztin und wissenschaftliche Assistentin an der Universitätsfrauenklinik des Inselspitals, Bern (Schweiz)